

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

SÍNTESIS Y CARACTERIZACIÓN PRELIMINAR DE ANDAMIOS  
MICROFIBRILARES DE ÁCIDO POLILÁCTICO E HIDROXIAPATITA  
DE ORIGEN BIOLÓGICO PARA LA REGENERACIÓN DEL TEJIDO  
ÓSEO.

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**C I R U J A N A D E N T I S T A**

**P R E S E N T A:**

**KATHERINE SCARLETT FUENTES PADILLA**

**TUTOR: DR. EDUARDO VILLARREAL RAMÍREZ**

**ASESOR: MTRO. OSMAR ALEJANDRO CHANES CUEVAS**

Cd. Mx.

**2019**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

*“Recuerda mirar siempre a las estrellas y no abajo hacia tus pies.”*

*Stephen W. Hawking*

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre Ma. Elena por tu amor, por tu paciencia, tu dedicación y esfuerzo constante para que yo pudiera lograr cada una de mis metas, por fomentar en mis, ideales y principios. Las palabras no alcanzan para agradecerte todo tu amor y apoyo en los momentos buenos y malos, sin ti esto no hubiera sido posible.

A mi abuela Pilar porque puedo decir plenamente que eres además de mi abuela, mi segunda madre, y los valores y los aportes que has realizado para mi vida son simplemente invaluable.

A mi hermano Kenet por ser mi fortaleza y mi mejor amigo, por mostrarme que en la vida se debe luchar por tus sueños a pesar de todo. Por ayudarme a superar cada adversidad con carácter y no dejarme caer jamás.

A Daniel por ir de la mano conmigo durante toda esta etapa. Por la inspiración para ser mejor cada día, y descubrir que podemos superarlo todo. Gracias por ser parte fundamental en mi vida y brindarme ese amor tan especial. Esto es nuestro.

A mis amigos especialmente a Lucy, Paul y a la Familia García Montes porque su apoyo incondicional fue muy importante en este momento, todos sus consejos los llevo en mi corazón.

A toda mi familia por sus porras al verme lograr cada una de mis metas.

A mi tutor Dr. Eduardo Villarreal Ramírez por sus enseñanzas, por confiar en mí y por ayudarme a creer que puedo lograrlo todo.

A mi asesor Mtro. Osmar Chanes Cuevas por guiarme en la experiencia de la bioingeniería en un laboratorio y por la gran aportación de su tiempo en este proyecto.

A los miembros del laboratorio de Bioingeniería de Tejidos, FO DEPEI UNAM en especial al Dr. Marco Antonio Álvarez Pérez y a la Dra. Patricia González Alva por el apoyo para realizar mi proyecto de investigación.

A Antonio Morales Espino del LAREC-IFUNAM por las mediciones de rayos X.

Al laboratorio de Cristalofísica y Materiales Naturales del Instituto de Física de la UNAM, por su colaboración en las técnicas de calorimetría y difracción de rayos X y en especial al Dr. Lauro Bucio Galindo por brindarme el apoyo en este proyecto.

Al laboratorio de Biomateriales del Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM y a la Dra. María Cristina Piña Barba, por la donación de la hidroxiapatita biológica.

A la Dra. Gloria Gutiérrez Venegas y a la Mtra. Viridiana Loustalot Angulo por su asesoría y apoyo en esta investigación.

A mi amada Universidad Nacional Autónoma de México la cual me brindó la oportunidad de desarrollarme tanto académica como culturalmente permitiéndome conocer y vivir todo lo que rodea a esta gran institución.

Se agradece el apoyo para la realización de este trabajo al proyecto PAPIIT/UNAM: IA207218. Katherine S. Fuentes Padilla agradece a la Beca de Proyecto de investigación/UNAM en el periodo 2018-2019 por la beca otorgada en este proyecto.

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>9</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>10</b>
<b>CAPÍTULO 1 ANTECEDENTES</b> .....	<b>12</b>
1.1 Tejido Óseo.....	13
1.1.1 Propiedades mecánicas.....	14
1.2 Hidroxiapatita (HA) .....	16
1.2.1 Estructura fisicoquímica .....	16
1.2.2 Propiedades mecánicas.....	17
1.3 Andamios.....	18
1.3.1 Biocompatibilidad .....	18
1.3.2 Biodegradabilidad .....	19
1.3.3 Bioactividad.....	19
1.3.4 Propiedades mecánicas.....	19
1.4 Ácido Poliláctico (PLA).....	20
1.5 Técnica de hilado por propulsión de gas .....	21
<b>CAPÍTULO 2 DISEÑO EXPERIMENTAL</b> .....	<b>23</b>
2.1 Planteamiento del problema .....	24
2.2 Justificación .....	24
2.3 Hipótesis.....	25
2.3.1 Verdadera .....	25
2.3.2 Nula.....	25
2.4 Objetivo general .....	25
2.5 Objetivos específicos.....	25
<b>CAPÍTULO 3 MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>26</b>
3.1 Materiales .....	27
3.2 Síntesis de Andamios PLA y PLA/HA orgánica .....	27
3.3 Obtención de HA orgánica .....	28
3.4 Difracción de rayos X (DRX) .....	28
3.5 Análisis de la morfología de andamios mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (MEB) .....	28
3.6 Análisis termogravimétrico (TGA) .....	29
3.7 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR).....	29
3.8 Pruebas mecánicas de andamios PLA y PLA/HA .....	29
3.9 Biocompatibilidad celular .....	30
3.9.1 Ensayo adhesión celular .....	30
3.9.2 Ensayo de proliferación celular (WST-1) .....	31

3.10	Análisis estadístico .....	31
<b>CAPÍTULO 4 RESULTADOS .....</b>		<b>32</b>
4.1	Difracción de Rayos-X .....	33
4.2	Evaluación morfológica de andamios PLA Y PLA/HA mediante microscopía óptica.....	34
4.3	Evaluación morfológica de andamios PLA y PLA/HA mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).....	35
4.4	Medición del diámetro de fibras.....	37
4.5	Termogravimetría (TGA).....	38
4.6	Caracterización por medio de FTIR .....	40
4.7	Pruebas mecánicas.....	41
4.7.1	Ensayo de resistencia a la tensión .....	41
4.7.2	Módulo de Young .....	42
4.8	Adhesión celular.....	43
4.9	Ensayo de proliferación celular.....	45
<b>CAPITULO 5 DISCUSIÓN.....</b>		<b>47</b>
<b>CAPÍTULO 6 CONCLUSIONES.....</b>		<b>55</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>		<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	• Organización jerárquica estructural del hueso.....	<b>13</b>
<b>Figura 2</b>	• Curva carga-desplazamiento del comportamiento biomecánico característico del hueso cortical y esponjoso.....	<b>15</b>
<b>Figura 3</b>	• Representación cristalográfica de la HA estequiométrica.....	<b>17</b>
<b>Figura 4</b>	• Estructura química del PLA.....	<b>21</b>
<b>Figura 5</b>	• Técnica de hilado por propulsión de gas.....	<b>22</b>
<b>Figura 6</b>	• Difractograma del análisis de refinamiento de Rietveld de HA.....	<b>33</b>
<b>Figura 7</b>	• Fotomicrografías de los compuestos de PLA 10%, PLA/HA 0.1 y PLA/HA 0.5 a un aumento de 20x.....	<b>34</b>
<b>Figura 8</b>	• Electrofotomicrografías de fibras PLA 10%.....	<b>35</b>
<b>Figura 9</b>	• Electrofotomicrografías de fibras PLA/HA 0.1 a diferentes aumentos.....	<b>36</b>
<b>Figura 10</b>	• Electrofotomicrografías de fibras PLA/HA 0.5 a diferentes aumentos.....	<b>37</b>
<b>Figura 11</b>	• Histograma de medición del diámetro de fibra del PLA 10%.....	<b>38</b>
<b>Figura 12</b>	• Histograma de medición del diámetro de fibra del PLA/HA 0.1 y PLA/HA 0.5.....	<b>38</b>
<b>Figura 13</b>	• TGA del PLA 10%, PLA/HA 0.1 y PLA/HA 0.5.....	<b>39</b>
<b>Figura 14</b>	• FTIR de HA, PLA, y los compuestos (PLA/HA 0.1 y PLA/HA 0.5).....	<b>40</b>
<b>Figura 15</b>	• Fotomicrografía de adhesión celular del compuesto de PLA 10%.....	<b>44</b>
<b>Figura 16</b>	• Fotomicrografía de adhesión celular del compuesto de PLA/HA 0.1 y 0.5.....	<b>44</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1</b>	• Propiedades mecánicas del hueso.....	<b>16</b>
<b>Tabla 2</b>	• Módulo elástico de la hidroxiapatita y tejidos mineralizados.....	<b>18</b>

<b>Tabla 3</b>	• Propiedades del Poli-ácido Láctico (PLA).....	<b>21</b>
<b>Tabla 4</b>	• Grupos funcionales de la HA, PLA, PLA/HA 0.1 y PLA/HA 0.5.....	<b>41</b>

### ÍNDICE DE GRÁFICAS

<b>Gráfica 1</b>	• Resistencia a la tensión de los distintos grupos de andamios.....	<b>42</b>
<b>Gráfica 2</b>	• Módulo de elasticidad de los distintos grupos de andamios .....	<b>43</b>
<b>Gráfica 3</b>	• Adhesión celular de los distintos grupos de andamios a las 4 y 24 hrs.....	<b>45</b>
<b>Gráfica 4</b>	• Proliferación celular de los distintos grupos de andamios a los 3, 5 y 7 días.....	<b>46</b>

### ÍNDICE DE ABREVIATURAS

<b>PLA</b>	• Ácido poliláctico
<b>HA</b>	• Hidroxiapatita
<b>HAb</b>	• Hidroxiapatita de origen biológico
<b>HAs</b>	• Hidroxiapatita sintética
<b>PLA/HAb</b>	• Ácido poliláctico con hidroxiapatita de origen biológico
<b>PLA/HAs</b>	• Ácido poliláctico con hidroxiapatita sintética
<b>AJS</b>	• Técnica de hilado por propulsión de gas
<b>MTT</b>	• Ensayo de azul triazol
<b>PBS</b>	• Solución amortiguadora
<b>ELISA</b>	• Análisis de inmunoabsorción unida a enzimas
<b>TGA</b>	• Termogravimetría

## RESUMEN

La ingeniería de tejidos es un campo nuevo de la ciencia, la cual tiene como objetivo último la regeneración tisular por medio de los conocimientos de la ingeniería, ciencia de materiales y la biología. La bioingeniería de tejidos ha desarrollado estructuras llamadas andamios que ofrecen soporte e inducen la regeneración tisular. En este estudio, se sintetizaron dos tipos de andamios microfibrilares de ácido poliláctico (PLA) con hidroxiapatita (HA) de origen biológico a diferentes concentraciones por medio de la técnica Air Jet Spinning (AJS), con la finalidad de mejorar las propiedades de biocompatibilidad y bioactividad del PLA. Los andamios sintetizados se analizaron mediante distintas técnicas para caracterizar sus propiedades físico-mecánicas y evaluar la respuesta biológica. Se formaron dos grupos de estudio y un grupo control, los cuales se sometieron a distintas pruebas de microscopía óptica (MO), microscopía electrónica de barrido (MEB), TGA, FTIR, mecánicas, adhesión y proliferación celular y DRX.

A través de MO y MEB se observaron fibras de diferentes diámetros, lineales e irregulares, esto debido a la presencia de HA, es de resaltar que el aumento en la concentración de HA, se encuentra ligado al aumento en el diámetro de las fibras y sus irregularidades. Con la técnica de TGA se observó una menor degradación en compuestos con mayor concentración de HA y con FTIR se corroboró la identidad de los compuestos. En las pruebas físicas se encontró que, a mayor concentración de HA, existió un aumento en su módulo de elasticidad, mientras que a menor concentración de HA hubo mayor resistencia a la tensión. La respuesta biológica en las pruebas de adhesión y proliferación celular se observó que a menor concentración de HA se obtuvo una menor adhesión celular, mientras que a mayor concentración de HA se obtuvo una mayor proliferación celular.

Con base en los hallazgos de las diversas pruebas podemos concluir que al adicionar HA a los andamios de PLA se aumentan sus propiedades y mejora la capacidad para poder ser una pieza fundamental en la regeneración ósea.

## INTRODUCCIÓN

La ingeniería de tejidos emerge como una alternativa prometedora para la regeneración tisular aplicando los principios de la ingeniería y la biología.<sup>1</sup> Un punto clave para lograr el objetivo es diseñar biomateriales con capacidad de igualar la estructura y composición del tejido de interés, como el óseo.<sup>2</sup> A pesar de existir varios materiales como los metales, cerámicos, polímeros y compuestos para sustituto del tejido óseo, estos materiales presentan un menor desempeño al ser comparados con los tejidos mineralizados.<sup>3</sup>

Los andamios ejercen un papel fundamental para la regeneración tisular ósea debido a su estructura tridimensional que permite el crecimiento celular,<sup>4</sup> guían la proliferación celular y sintetizan la matriz extracelular; favoreciendo la regeneración de los tejidos y órganos.<sup>5</sup> Existen requisitos básicos para el diseño de andamios poliméricos, los cuales son: una tasa de degradación idónea para que coincida con la formación del tejido, integridad mecánica para poder preservar la estructura del tejido, no ser citotóxico y una adecuada interacción celular.<sup>4</sup>

Actualmente, una de las propuestas de vanguardia es el uso de materiales compuestos de polímeros/biocerámicos. El ácido poliláctico (PLA) debido a su grupo metilo adicional lo convierte en un material hidrófobo conduciéndolo a una tasa de hidrólisis lenta y con una mayor integridad mecánica *in vitro* o *in vivo*, en comparación con otros polímeros.<sup>6</sup> Por otro lado, se encuentra la hidroxiapatita (HA), por sus propiedades de osteoconducción y osteoinducción, es la cerámica por excelencia para injertos óseos debido a que es el componente mineral de la matriz ósea. De esta manera, se piensa que, al unir sus propiedades, se convertirán en un excelente candidato para andamios en la regeneración ósea.<sup>7</sup>

Para evaluar dichas propiedades e interacciones entre el PLA y la HA se realizan pruebas físico-mecánicas y biológicas de las cuales destacan la microscopia electrónica de barrido la cual nos permite observar las características

ultraestructurales de los andamios, la difracción de rayos X nos proporciona una lectura de la presencia de moléculas de diversos materiales, en este caso, la molécula hexagonal de HA en presencia de rayos X. Para conocer el grado de degradación de estos componentes en conjunto o por separado se utiliza una prueba de termogravimetría, la cual nos indica la temperatura y porcentaje de degradación de nuestros compuestos. El análisis por medio de espectrometría infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) nos ayuda a conocer los grupos funcionales presentes en dichos compuestos por medio de absorbancia de radiaciones infrarrojas. En la evaluación de las propiedades mecánicas generalmente se utilizan la resistencia a la tensión y el modulo de elasticidad que nos da un enfoque de la resistencia que tendrá dicha estructura. De las pruebas, la mas importante es la citotoxicidad la cual se engloba en adhesión celular y proliferación celular, las cuales nos comprueban la capacidad que tendrán para regenerar tejidos.

La técnica de hilado por propulsión de gas (AJS), es una técnica con la capacidad de obtener membranas microfibrilares de PLA/HA para el estudio y uso en el campo de la ingeniería de tejido óseo en la odontología.<sup>8</sup>

# **CAPÍTULO 1**

# **ANTECEDENTES**

## 1.1 Tejido Óseo

El tejido óseo es un tejido conjuntivo duro especializado que forma parte de los organismos vertebrados, está constituido por células y una matriz extracelular mineralizada.<sup>9</sup> Participa en la locomoción corporal, proporcionando la capacidad de carga a los músculos y brinda protección a órganos internos. Tiene en su interior las células pluripotenciales que llevan a cabo la hematopoyesis, así mismo mantiene la homeostasis de electrolitos por medio del almacenamiento de iones de minerales.<sup>10</sup>

Este tejido está compuesto por dos fases, la fase orgánica que está constituida en un 95% de fibras de colágeno tipo I, mientras el 5% restante pertenece a proteínas no colágenas (NCPs *por sus siglas en inglés: NonCollagenous Proteins*) como: osteocalcina, osteopontina, osteonectina, sialoproteína ósea y proteoglicanos; las cuales contribuyendo a la elasticidad y a la resistencia a la tensión del tejido óseo.<sup>11</sup> La fase inorgánica está compuesta de cristales de hidroxiapatita  $[(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  proporcionándole la dureza y rigidez al tejido.<sup>12</sup>

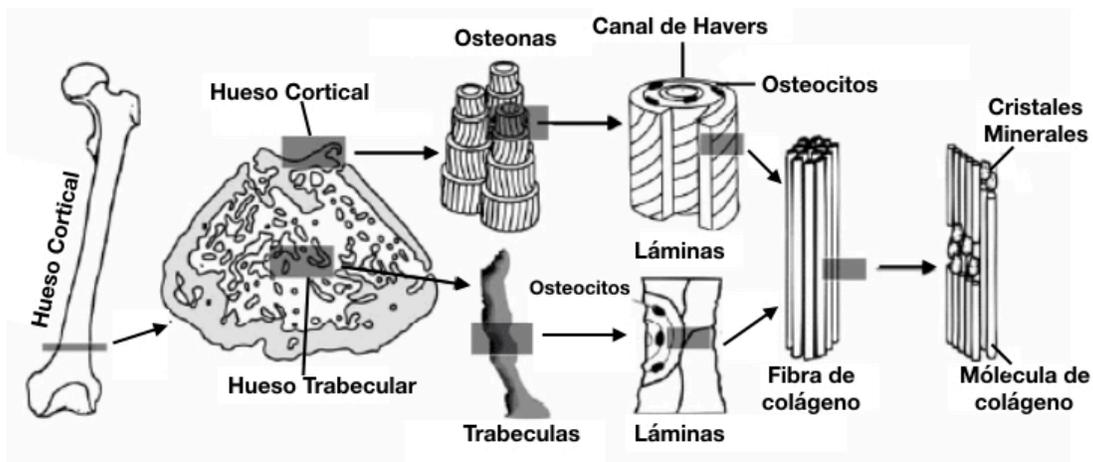


Figura 1.- Organización jerárquica estructural del hueso.<sup>13</sup>

### 1.1.1 Propiedades mecánicas

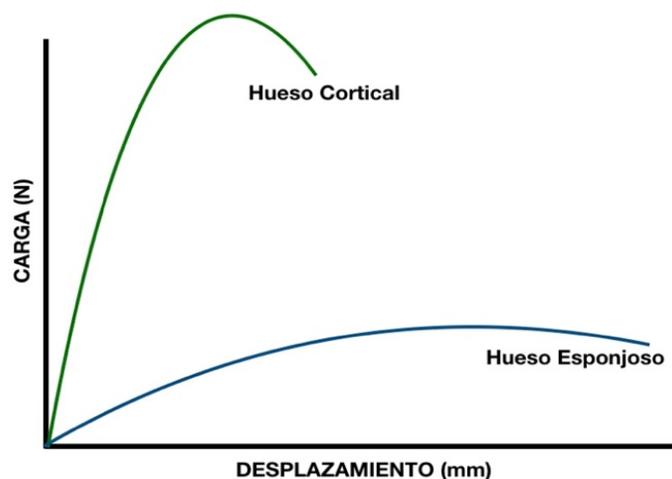
La estructura del tejido óseo le permite tener propiedades mecánicas únicas de resistencia, rigidez y elasticidad.<sup>14</sup> Las fases orgánica e inorgánica son las responsables de la fuerza de tensión, flexibilidad y rigidez del tejido esto gracias a la deposición de los cristales de HA entre los espacios de las moléculas de colágena.<sup>15</sup> Para obtener las propiedades mecánicas a cualquier material se le realizan pruebas de compresión y tracción, y proporcionan valores de la resistencia del material y del módulo de Young.<sup>13</sup>

El módulo de Young o elástico representa la fuerza elástica con respecto a la deformación elástica, de manera que cuanto menor sea la deformación originada por la fuerza dada, mayor será el módulo de Young, esto se expresa en unidades de fuerza por unidad de área.<sup>15</sup>

Los tejidos óseos por su estructura y función pueden clasificarse en hueso cortical y hueso trabecular.<sup>9</sup> El hueso cortical está formado por unidades cilíndricas superpuestas denominadas sistema de Havers, que conforman una unidad funcional llamada osteona. Los canales de Havers están conectados unos a otros por medio de los canales de Volkman y a su vez se conectan con el periostio, ambos tipos de canales son utilizados por vasos sanguíneos, linfáticos y nervio para extenderse por el todo el tejido óseo.<sup>16</sup> El hueso esponjoso a diferencia del hueso cortical no contiene osteonas, en su lugar contiene laminas intersticiales dispuestas de forma irregular formando placas, llamadas trabéculas. Las trabéculas forman una estructura esponjosa dejando huecos, las cuales contienen a la médula ósea roja. En las trabéculas se encuentran los osteocitos dentro de sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. Los vasos sanguíneos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos.<sup>9</sup>

El tejido óseo contiene cuatro tipos de células: osteoblastos, células de revestimiento óseo, osteocitos y osteoclastos. Los osteoblastos son los encargados de la formación de matriz ósea por el proceso de aposición para posteriormente convertirse en osteocitos. Los osteocitos son células maduras con la función de sintetizar y de reabsorber limitadamente los componentes de la matriz ósea. Las células de revestimiento óseo son osteoblastos inactivos, y ayudan a revestir las superficies óseas del interior de los huesos. Por último, se encuentran los osteoclastos que llevan a cabo la resorción ósea.<sup>17</sup>

Las diferencias morfológicas y estructurales entre el hueso cortical y el hueso esponjoso, da como resultado comportamientos biomecánicos distintos.<sup>18</sup> El hueso cortical tiene un módulo elástico mayor, y por lo tanto su curva de esfuerzo-deformación presenta una mayor pendiente (Fig. 2). Lo cual demuestra una capacidad de soportar una mayor carga por unidad de superficie, con un índice mínimo de deformación, y una mayor rigidez.<sup>13</sup> El hueso esponjoso presenta un módulo de Young menor mostrando una menor pendiente, lo que significa que la carga capaz de soportar por unidad de superficie es menor y su índice de deformación es mayor. Como resultado el hueso esponjoso presenta una flexibilidad superior a la del hueso cortical (Tabla 1).<sup>19</sup>



**Figura 2.-** Curva carga-desplazamiento del comportamiento biomecánico característico del hueso cortical y esponjoso.<sup>13</sup>

**Tabla 1.-** Propiedades mecánicas del hueso.<sup>20</sup>

	Módulo de Young	Resistencia a la compresión
<b>HUESO CORTICAL</b>	15-20 GPa	0.1-2 GPa
<b>HUESO ESPONJOSO</b>	100-200 MPa	2-20 MPa

## 1.2 Hidroxiapatita (HA)

La hidroxiapatita (HA) tiene una fórmula química  $[Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2]$  y se encuentra en el tejido óseo, los órganos dentarios y en algunas condiciones patológicas como en la aterosclerosis.<sup>21</sup> Las características fisicoquímicas de HA la convierten en un material idóneo para diversas aplicaciones en la medicina ortopédica como sustituto óseo o revestimiento de implantes metálicos. La HA presenta propiedades de bioactividad, biocompatibilidad, estabilidad, osteoconducción y no presenta toxicidad. Además, en la odontología es usada frecuentemente como relleno en defectos óseos creados por lesiones en maxilares, aumento de rebordes alveolares atróficos, cubierta de implantes metálicos y cirugía ortognática.<sup>22, 23</sup>

### 1.2.1 Estructura fisicoquímica

La HA forma parte de las apatitas de fosfato de calcio, siendo su fórmula química general  $Ca_5(PO_4)_3X$ . En donde X, es el elemento electronegativo (halógeno o hidroxilo). La HA tiene una relación molar estequiométrica Ca/P de 1.67, con una estructura cristalográfica hexagonal del grupo espacial  $P6_3/m$  y parámetros de red  $a=b=9.42\text{Å}$  y  $c=6.88\text{Å}$ , en donde  $P6_3/m$  es un grupo espacial con un eje de simetría "c" con seis ejes perpendiculares a tres equivalentes ( $a_1, a_2, a_3$ ) en los ángulos  $120^\circ$ .<sup>24</sup>

Su representación cristalográfica de la celda unidad de HA, consiste en el entrelazamiento de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{-3}$  y grupos  $\text{OH}^-$  visto desde el plano (001). (Fig. 3a). Los bordes de la celda unidad están delimitados por átomos de  $\text{Ca}^{2+}$  columnar ( $\text{Ca}^{2+}$  I), y en el interior se ubica un grupo OH que está rodeado por átomos de Ca II de esta manera forma un par de triángulos superpuestos localizados en paralelo al plano basal en  $Z=1/4$  y  $z=3/4$  con un ángulo de  $60^\circ$  en relación al otro (Fig. 3b). En medio de los átomos de Ca se encuentran 6 tetraedros fosfóricos distribuidos de tal modo que tres de ellos se encuentran en el plano triangular del Ca II  $Z \frac{1}{4}$  y los otros tres en el otro plano triangular del Ca II  $Z \frac{3}{4}$  (Fig. 3b). El crecimiento preferencial de la HA en el eje (001) presenta una morfología de un prisma hexagonal (Fig. 3c) <sup>24, 25, 26</sup>

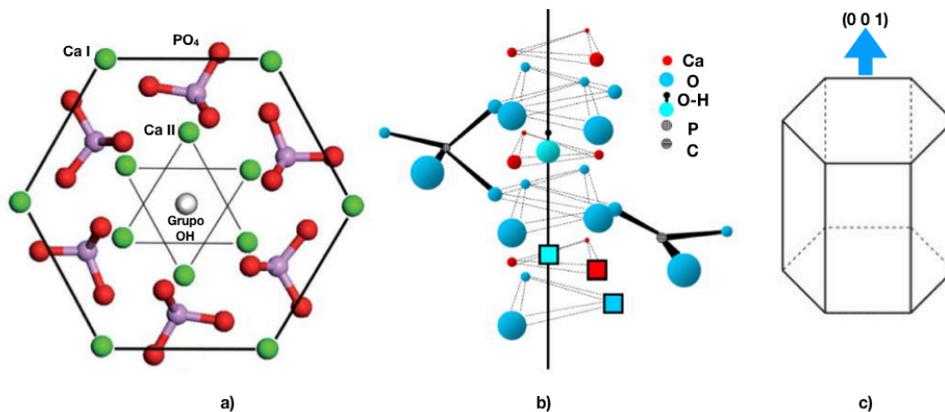


Figura 3.- Representación cristalográfica de la HA estequiométrica.<sup>26</sup>

### 1.2.2 Propiedades mecánicas

Las propiedades mecánicas de la HA son comparadas con los distintos tejidos mineralizados del cuerpo humano (dentina, esmalte y hueso) de los cuales el que presenta mayor porcentaje de material inorgánico es el esmalte, por lo tanto, es el que tiene un mayor módulo de elasticidad comparado con el hueso y la dentina, sin embargo, por si sola la HA ya sea orgánica o sintética supera el módulo de elasticidad de los tejidos mineralizados (Tabla 2).<sup>27</sup>

**Tabla 2.-** Módulo elástico de la hidroxiapatita y tejidos mineralizados.<sup>27</sup>

Material	Módulo de Young
Hidroxiapatita (orgánica)	144 GPa
Hidroxiapatita (sintética)	117 GPa
Esmalte	74 GPa
Hueso humano	24.6-35 GPa
Dentina	21 GPa

### 1.3 Andamios

Los andamios tienen como objetivo principal promover la regeneración de tejidos lesionados, imitando las funciones de la matriz extracelular las cuales son: el soporte celular, proporcionar un sustrato para la migración y la supervivencia de las células; secuestrar factores de crecimiento y otras señales químicas que regulan el destino celular; presentar secuencias de péptidos bioactivos que pueden unirse directamente a los receptores y activar las vías de señalización intracelular, esto con la finalidad de regresar al tejido u órgano la mayor funcionalidad posible.<sup>28</sup> Existen numerosos biomateriales para tejidos óseos y diversas técnicas de fabricación, pero las características que todos ellos deberían cumplir son las siguientes: biocompatibilidad, biodegradabilidad, osteoactividad y poseer propiedades mecánicas aproximadas al tejido receptor.<sup>29</sup>

#### 1.3.1 Biocompatibilidad

La biocompatibilidad como principio otorga la adhesión celular para que su funcionamiento sea óptimo y poder llevar a cabo la migración celular suficiente para comenzar a proliferar antes de definir una nueva matriz. Posterior a la implantación del andamio, idealmente sólo se debería presentar una reacción inmune

insignificante de tal forma se evitaría una respuesta inflamatoria severa. De este modo se evita alterar el proceso de cicatrización o promover el rechazo al andamio.<sup>30</sup>

### **1.3.2 Biodegradabilidad**

El reemplazo de los andamios implantados con tejidos propios del huésped es uno de los objetivos más importantes en la ingeniería de tejidos, al considerar a los andamios como simples facilitadores de la regeneración tisular. Por ese motivo los andamios deben ser biodegradables y permitir a las células producir su propia matriz extracelular.<sup>31</sup> La degradación ideal no debería producir elementos tóxicos que afecten al organismo, y por ende puedan ser eliminados del cuerpo sin afectar a ningún órgano o tejido.<sup>32, 33</sup>

### **1.3.3 Bioactividad**

Los andamios al interactuar con los tejidos deberían facilitar y regular las actividades propias del tejido para su regeneración. Los andamios deben proporcionar señales biológicas para favorecer el reclutamiento, diferenciación, adhesión y proliferación celular para proporcionar las condiciones idóneas para la regeneración tisular.<sup>34</sup>

### **1.3.4 Propiedades mecánicas**

Idealmente las propiedades mecánicas del andamio deben ser firmes con el sitio anatómico en el que se implantará, teniendo en cuenta la dureza que permita el manejo quirúrgico. Sin embargo, la producción de andamios para tejido óseo es un gran desafío, deben presentar suficiente integridad mecánica para que funcione inmediatamente después de la implantación hasta el proceso final de la remodelación ósea.<sup>35</sup> Además, debe existir un equilibrio entre la arquitectura del

andamio y las propiedades mecánicas para permitir la filtración celular y la vascularización.<sup>30</sup>

#### 1.4 Ácido Poliláctico (PLA)

El Ácido Poliláctico (PLA *por sus siglas en inglés: Poly Lactic Acid*) es un polímero termoplástico y biodegradable aprobado por la Food Drug Administration (FDA) que fue descubierto por el químico sueco Carl Wilhelm Sheele en el año 1780.<sup>36</sup> La química del PLA envuelve el procesamiento y polimerización del ácido láctico (ácido 2-hidroxiopropionico), debido a que es una molécula quiral simple presente en dos isómeros ópticos: el poli L-láctico (PLLA) y el poli D-láctico, en la cual la L es diferente en su efecto sobre luz polarizada en comparación con la forma D, en otras palabras para el L-ácido láctico su plano quiral gira levógiramente, mientras que la forma D lo hace dextrógiramente para obtener alto peso molecular y polímeros semicristalinos o amorfos. La polimerización del ácido láctico a PLA se puede lograr mediante un proceso de condensación directa que involucra solventes a alto vacío. Alternativamente, en un proceso libre de solventes, se forma un intermedio de dímero cíclico llamado láctida seguido de una polimerización de apertura de anillo catalítico de la láctida cíclica<sup>37, 38</sup>

En la actualidad, el PLA, se considera uno de los polímeros más usados en la ingeniería de tejidos, por poseer estabilidad térmica, buenas propiedades mecánicas, biocompatibilidad, baja toxicidad y biodegradabilidad.<sup>39</sup> Las propiedades de degradación del PLA dependen de la elección y distribución de los estereoisómeros dentro de las cadenas de polímeros (relaciones L / D) y pesos moleculares. Dependiendo de la elección de los prepolímeros y la ruta de síntesis, se puede lograr una gran diversidad de PLA dando como resultado PLA con una amplia gama de propiedades fisicoquímicas.<sup>40, 41</sup>

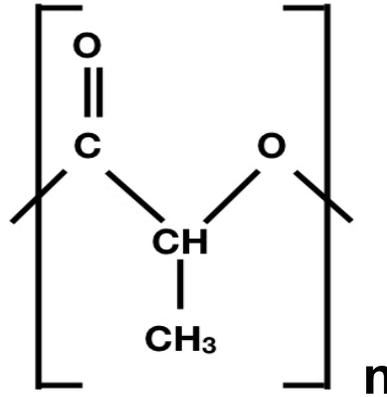


Figura 4.- Estructura química del PLA.

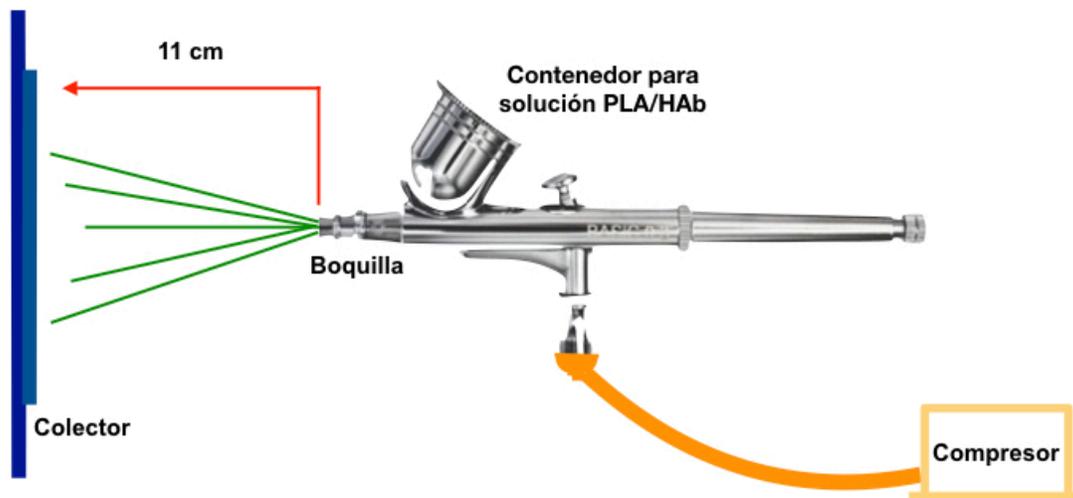
Tabla 3.- Propiedades del Poliácido Láctico (PLA).<sup>42</sup>

Polímero	Propiedades térmicas y mecánicas		Propiedades de degradación	Procesamiento y aplicaciones		
	Temperatura de fusión (° C)	Temperatura de transición vítrea (° C)	Tiempo (meses)	Solvente	Aplicaciones	
<b>PLA</b>	173-178	60-65	1.5-2.7	12-18	Cloroformo Dioxano Diclorometano Etilacetato Acetona Tetrahidrofurano Hexafluoroisopropanol	Fijación de fracturas Tornillos de interferencia Anclajes de sutura Reparación de meniscos

## 1.5 Técnica de hilado por propulsión de gas

El hilado por propulsión de gas (*AJS por sus siglas en inglés: Air Jet Spinning*) es una técnica para la producción de microfibras y nanofibras hiladas de materiales poliméricos y de materiales compuestos.<sup>43</sup> Esta técnica se basa en el uso de aire o

gas a una presión regulada para poder eyectar la solución de polímero en fibras delgadas en la salida de la boquilla. Posteriormente, el solvente se evapora durante la formación y depósito de las fibras sobre el sustrato (Fig.5).<sup>44</sup> El sistema tiene muchas ventajas como: bajo costo, facilidad de uso, no requiere equipos sofisticados, capacidad de escalamiento y un corto periodo de fabricación.<sup>45</sup>



**Figura 5.-** Técnica de hilado por propulsión de gas.

# **CAPÍTULO 2**

# **DISEÑO EXPERIMENTAL**

## 2.1 Planteamiento del problema

La ingeniería de tejidos emerge como una alternativa prometedora en el tratamiento de regeneración tisular por medio de biomateriales capaces de formar estructuras o andamios donde se permita la colonización celular para tratar de recuperar un tejido perdido. Sin embargo, no se ha encontrado un biomaterial ideal para regenerar al cien por ciento un tejido. Los biomateriales derivados del ácido láctico son prometedores debido a su respuesta biológica. La hidroxiapatita natural es la cerámica para uso médico y odontológico más estudiada, debido a su origen biológico y su mayor solubilidad ha demostrado tener una mejor respuesta biológica *in vitro*. Por lo cual, se investigará si el compuesto de PLA/HA orgánica tendrá una mejor respuesta biológica en comparación con el compuesto de PLA.

## 2.2 Justificación

La pérdida de la continuidad en los tejidos debido a una enfermedad o un trauma, o incluso anomalías congénitas son asuntos importantes de salud pública. Para un paciente es de vital importancia recuperar su funcionalidad fisiológica y estética. Por lo tanto, la bioingeniería de tejidos ha hecho varios esfuerzos para desarrollar nuevos materiales para promover la regeneración de los tejidos. Los andamios, en la bioingeniería de tejidos, son biomateriales los cuales actuaran como plantillas para el crecimiento y recolonización celular de los tejidos dañados a manera de un conductor y modulador del crecimiento celular. Los andamios son sintetizados a partir de distintas materias primas como polímeros, cerámicos y materiales compuestos. La mayoría de los andamios son utilizados para reemplazar una gran variedad de tejidos como piel, tendones, hueso, córnea, entre otros. Uno de los polímeros más utilizados es el ácido poliláctico (PLA) dadas sus propiedades de biocompatibilidad, capacidad de ser biodegradable, y no ser tóxico porque sus productos de degradación son el agua y el CO<sub>2</sub>. Los andamios poliméricos, pueden ser dopados con distintos compuestos con el fin de aumentar la adhesión y proliferación celular. Nosotros proponemos la síntesis de andamios de PLA dopados con hidroxiapatita orgánica para aumentar la adhesión y proliferación celular.

## **2.3 Hipótesis**

### **2.3.1 Verdadera**

Los andamios fibrilares de PLA permiten la adhesión y proliferación celular, sin embargo, nosotros suponemos que al dopar a las fibras de PLA con partículas de hidroxiapatita orgánica se incrementará la respuesta celular en la adhesión y la proliferación con respecto a los andamios de PLA.

### **2.3.2 Nula**

Si la hidroxiapatita orgánica no tiene ningún efecto sobre la adhesión y proliferación celular, entonces los andamios fibrilares de PLA/HA orgánica no tendrán ninguna diferencia significativa en comparación del grupo control PLA.

## **2.4 Objetivo general**

Sintetizar y realizar una caracterización preliminar de andamios microfibrilares poliméricos de PLA con HA orgánica que permitan una mayor proliferación celular.

## **2.5 Objetivos específicos**

- 1) Sintetizar andamios microfibrilares poliméricos de PLA a dos concentraciones distintas de cristales de HA orgánica.
- 2) Caracterizar mediante microscopía óptica y electrónica los andamios fibrilares de PLA/HA orgánica.
- 3) Establecer el efecto de los cristales de HA orgánica y sus distintas concentraciones en la proliferación celular.

# **CAPÍTULO 3**

# **MATERIALES Y**

# **MÉTODOS**

### **3.1 Materiales**

Ácido poliláctico granulado (PLA, Mw=192,000, Nature Works® D2002), Hidroxiapatita Natural (Biocriss Nukbon®), Cloroformo (CHCl<sub>3</sub>, J.T Baker®), Etanol (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH ≥ 99.5%, SIGMA-ALDRICH®), agitador magnético (Thermo Scientific®), balanza analítica (aeADAM®), Kit Cristal Violeta (Sigma-Aldrich®), Kit WST-1 (Cloruro de 2,3,5-trifenil-2H-tetrazolio) (Sigma-Aldrich®), lector de ELISA (CHROMATE®, Awareness Technology Inc.), máquina de pruebas Universal (INSTRON® modelo 3365), microscopio electrónico de barrido (JOEL® JSM 7600F).

### **3.2 Síntesis de Andamios PLA y PLA/HA orgánica**

Se realizó una solución de PLA al 10% utilizando disolvente de cloroformo y se mantuvo en agitación magnética durante 24 horas. Después, se le añadió etanol a la solución para obtener una razón final de 3:1 cloroformo-etanol y se mantuvo en agitación magnética durante 4 horas. La solución anterior se usó para la síntesis de los andamios control y como base para la preparación de los andamios experimentales “A” y “B”. Para los estudios posteriores se utilizaron dos soluciones experimentales. La primera solución experimental “Grupo A” es PLA 10% + 0.1 g de HA orgánica y la segunda solución experimental “Grupo B” es PLA 10% + 0.5 g de HA orgánica.

Para el depósito de los andamios se usaron las soluciones anteriores, mediante un dispositivo de hilado por propulsión de gas. El depósito de los andamios se realizó a temperatura ambiente, con una punta de 0.3 mm con doble acción/mezcla interna y una copa de alimentación por gravedad. El proceso se realizó a una presión de aire de 30 PSI durante 15 minutos. La distancia entre el colector y la punta AJS fue de 11 cm, para la obtención de fibras ultra finas y la evaporación del disolvente.

### **3.3 Obtención de HA orgánica**

La HA orgánica (Nukbone®) proviene de la compañía Biocriss, en una presentación de tamaño de partícula de 250-500  $\mu\text{m}$ . Para obtener tamaños nanocristalinos de HA se realizó una molienda de HA. Este procedimiento se llevó a cabo en el laboratorio de materiales naturales, sintéticos y arqueometría del Instituto de Física de la UNAM. Se usó un mortero de bolas de ágata en un molino planetario, a una velocidad de 600 rpm durante 8 horas.

### **3.4 Difracción de rayos X (DRX)**

Para determinar el tamaño de partícula obtenido en la molienda de HA, se utilizó la difracción de rayos X. Las mediciones de difracción de rayos X se adquirieron utilizando un modelo de difractómetro (Difractómetro de rayos X Phillis X'Pert con geometría de Bragg-Brentano) que tiene un  $\text{CuK}\alpha$  ( $\lambda = 0.15406 \text{ \AA}$ ) a temperatura ambiente. Los patrones de difracción de rayos X se investigaron en el rango de  $2\theta$  entre  $4^\circ$  y  $110^\circ$ .

### **3.5 Análisis de la morfología de andamios mediante microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (MEB)**

Los andamios se depositaron durante 15 segundos en un portaobjetos y se observaron en un microscopio óptico Amscope® T530a y se observaron a 20x para el estudio de su morfología. Para estudiar la morfología en una mayor resolución se usó el microscopio electrónico de barrido (MEB) JOEL JSM 7600F®. Las muestras se montaron sobre barriles de aluminio y adhirieron con cinta carbón doble cara y se recubrieron con Au para aumentar su conductividad mediante la técnica de Sputtering durante 5 minutos.

### **3.6 Análisis termogravimétrico (TGA)**

Los experimentos de calorimetría se realizaron en un calorímetro TA Instruments® Calorimetry SDT Q600. Las mediciones se iniciaron a temperatura ambiente y se terminaron a 1000 °C, con una tasa de calentamiento de 10 °C/min a una atmósfera de oxígeno con un crisol de alúmina. Se analizó también la primera derivada para determinar donde inician los cambios en el peso de las muestras y temperaturas específicas de reacción, utilizando el programa ORIGIN® 8.0 de OriginLab corporation, Northampton, Ma para Sistema operativo Windows®.

### **3.7 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)**

La caracterización de los grupos funcionales de los andamios se obtuvo mediante la técnica de Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR) y un equipo Nicolet® 680. Al absorber la radiación infrarroja sus moléculas captan los cambios entre estados de energía vibracional lo que hace capaz de caracterizar los principales grupos funcionales de la estructura molecular de los compuestos de PLA, HA, grupo control y grupos experimentales A y B. El análisis de los espectrogramas se realizó usando el programa ORIGIN® 8.0.

### **3.8 Pruebas mecánicas de andamios PLA y PLA/HA**

Se cortaron 13 muestras por cada grupo de estudio de acuerdo a las especificaciones de la norma ASTM-D1708. Se midió el grosor de cada muestra de los andamios del grupo control y los grupos experimentales A y B con un micrómetro digital Starrett® dato que fue ingresado a una maquina universal de pruebas INSTRON® para el registro de la medición de tensión y módulo de elasticidad fijado a una velocidad de prueba de 1mm/min siguiendo las especificaciones de la norma.

## 3.9 Biocompatibilidad celular

### 3.9.1 Ensayo adhesión celular

Para los ensayos de adhesión celular se usaron los andamios con un corte circular de un diámetro de 8 mm y se esterilizaron con una solución antibióticos/etanol durante 1 hora y una hora de exposición a luz UV. Los andamios se colocaron en una placa de cultivo celular de 24 pozos. En la placa de cultivo celular se sembraron fibroblastos de pulpa dental humana previamente caracterizados a una densidad de  $5 \times 10^3$  en cada pozo, los tiempos de cultivo fueron de 4 y 24 horas en medio  $\alpha$ -MEM para evaluar su adhesión. Una vez terminado el tiempo de estudio, se retiró el medio y se realizaron tres lavados con PBS (solución amortiguadora de fosfatos) para remover a las células que no se adhirieron a la superficie. Las células adheridas al andamio se fijaron con glutaraldehído al 2% durante 1 hora y después se procedió a lavar con PBS.

Para la evaluación de la adhesión celular se utilizó el método de cristal violeta al 1%, solución que fue preparada agregando en un frasco ámbar 1 gr de cristal violeta, 20 ml de etanol al 95%, 0.8 gr de oxalato de amonio y 100 ml de agua destilada, que se dejó reposar durante 24 horas para su uso.

Con esta solución se llevó acabo la tinción que consistió en adicionar a cada pozo con las muestras del grupo control y grupos experimentales A y B 200  $\mu$ L de cristal violeta al 0.1% durante 30 minutos. Después, se realizaron 4 lavados con agua bidestilada para la remoción del colorante no específico. Posteriormente, se extrajo el colorante agregando 200  $\mu$ L de dodecilsulfato de sodio (SDS) al 1%. De la solución se tomó 200  $\mu$ L para colorarla en un plato lector y fue leído para su análisis de inmunoabsorción unida a enzima (ELISA *por sus siglas en inglés: Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*), a una absorbancia de 545 nm. El experimentó de adhesión se realizó por triplicado.

### 3.9.2 Ensayo de proliferación celular (WST-1)

Se evaluó la citotoxicidad de los andamios del grupo control y grupos experimentales A y B mediante el ensayo de WTS-1 permitiendo analizar de una forma directa la viabilidad celular y de una manera indirecta, medir la proliferación celular por medio de cuantificación espectrofotométrica basada en la degradación de sales de tetrazolium WST-1 a sales de formazán, mediante la acción de las deshidrogenadas mitocondriales que se producen de forma natural cuando las células son viables. Se sembraron  $5 \times 10^3$  de fibroblastos de pulpa dental humana sobre los andamios del grupo control y grupos experimentales A y B y posteriormente en 100 ml de medio  $\alpha$ -MEM se incubó durante 3, 5 y 7 días. Después de cada periodo experimental, los fibroblastos se incubaron con 10  $\mu$ L de WTS-1 (SIGMA-ALDRICH®) a 37°C durante 4 horas. Después de este tiempo, 100  $\mu$ L del sobrenadante se colocaron en una placa de lectura de 96 pozos y mediante un lector ELISA se evaluó la densidad óptica a una longitud de onda de 450 nm. Los experimentos se realizaron por triplicado en todos los grupos.

### 3.10 Análisis estadístico

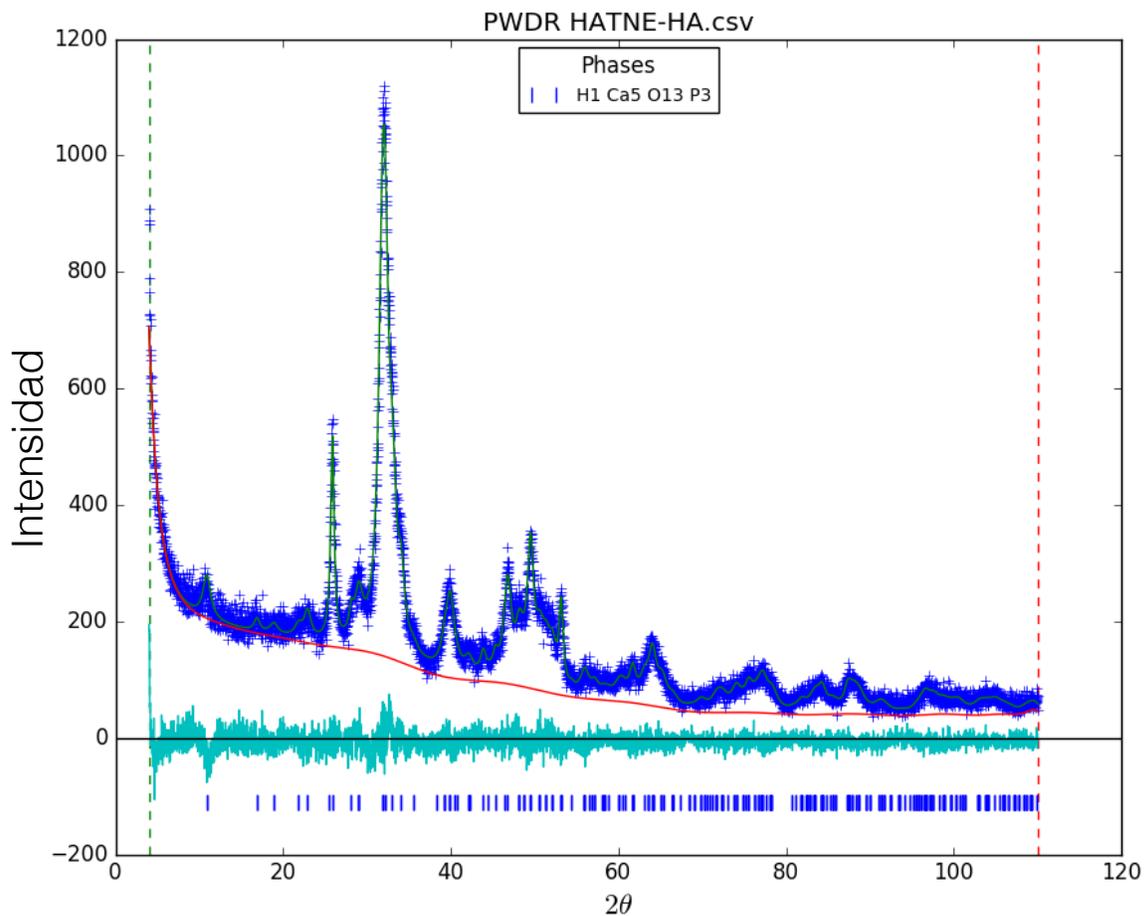
Se realizó el análisis estadístico descriptivo mediante las medidas de tendencia central y dispersión para describir a los grupos, para el análisis estadístico se utilizó el programa GraphPad Prism® para Windows, Versión 8.0 San Diego, CA: GraphPad Software, Inc., con el cual se aplicó una prueba estadística ANOVA (*por sus siglas en inglés: Analysis of Variance*) con el fin de observar la asociación entre los grupos en los ensayos de resistencia a la tensión, proliferación celular, módulo de Young y adhesión celular. Adicionalmente en los ensayos de resistencia a la tensión y proliferación celular se realizó una prueba post hoc de comparación múltiple de Tukey; para el ensayo de módulo de Young se utilizó una comparación múltiple de Dunnett y en el ensayo de adhesión celular fue una comparación múltiple de Sidak. Se calculó el riesgo relativo para los resultados binomiales con un IC de 95%. El error alfa fue ajustado menor del 5% tomando como significativo ( $p < 0.05$ ).

# **CAPÍTULO 4**

# **RESULTADOS**

## 4.1 Difracción de Rayos-X

Los patrones de difracción de rayos X a temperatura ambiente de HA se muestran en la Fig. 6. El patrón de DRX de las nanopartículas de HA revela la existencia de picos característicos a  $25.60^\circ$  y  $32.06^\circ$  correspondientes a los planos de difracción (002) y (112), respectivamente. Lo cual indica una estructura hexagonal en el grupo espacial  $P6_3/m$ .

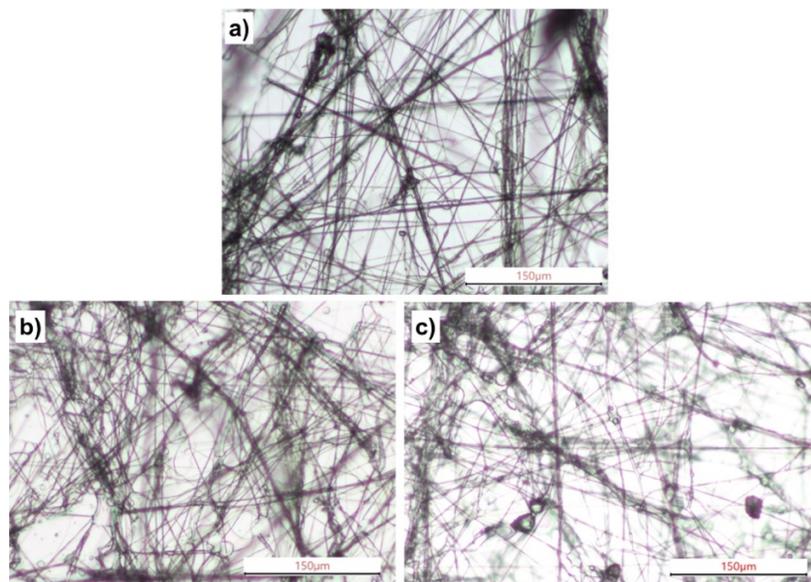


**Figura 6.-** Difractograma del análisis de refinamiento de Rietveld para hidroxipatita después de la molienda. Observado (cruces azules), calculados (línea verde continua) y de diferencia (trazo cian); son representados en la gráfica; las marcas azules verticales (en la parte inferior del difractograma) corresponden a las reflexiones de Bragg permitidas para la estructura cristalina de la hidroxipatita.

## 4.2 Evaluación morfológica de andamios PLA Y PLA/HA mediante microscopía óptica.

Se observaron en un microscopio óptico a los andamios del grupo control y los grupos experimentales A y B en un campo claro y un aumento de 20x. La fotomicrografía correspondiente al grupo control, figura 7a, se observa una red con acumulación de fibras en las intersecciones, mayormente se presentan una forma regular y pocas fibras irregulares. En su mayoría son lineales, lisas con una variación en el grosor y en dirección vertical, horizontal y diagonal.

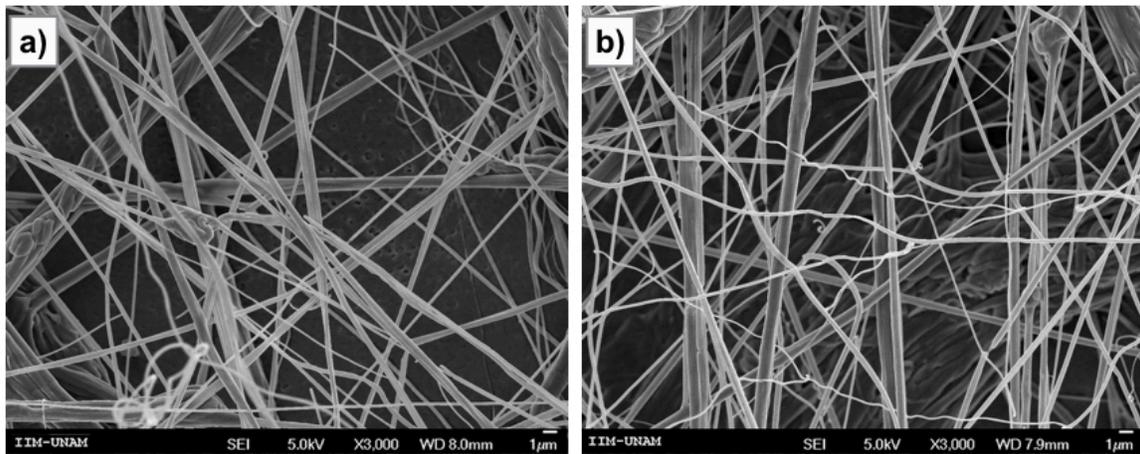
El grupo experimental A se muestra en la figura 7b, se aprecian fibras dispuestas en red con mayor acumulamiento en comparación con el grupo control. Las fibras son irregulares, con ligeras curvas y rugosidades que pertenecen a las partículas de HA. Además, se observan variaciones en el grosor y dirección. En el grupo experimental B se observa en la figura 7c, mostrando fibras con disposición en red y menor acumulación entre ellas, irregulares con presencia de curvas y rugosidades de gran tamaño correspondientes a la HA sobre las fibras. Con diferencias en el grosor y una posición multidireccional, en comparación a los grupos anteriores.



**Figura 7.-** Fotomicrografías de los compuestos a un aumento de 20x. a) Red fibrilar de PLA 10% lisas y lineales, grupo control. b) Fibras irregulares de PLA 10% con HA 0.1, grupo experimental A, rugosas y de diferentes grosores y c) Fibras de PLA 10% con HA 0.5, grupo experimental B, forman una red con acumulaciones de partículas de HA de sobre ellas.

### 4.3 Evaluación morfológica de andamios PLA y PLA/HA mediante Microscopía Electrónica de Barrido (MEB).

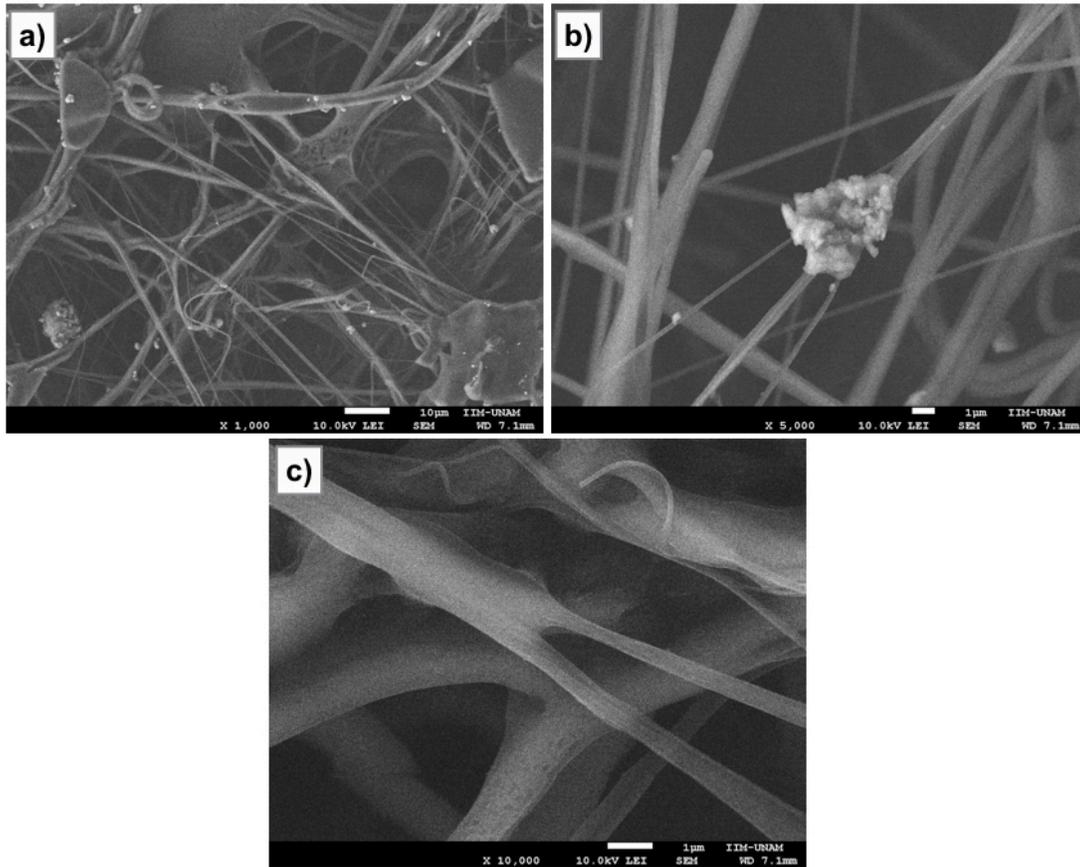
Para continuar los estudios de la morfología de las fibras a una mayor resolución, se utilizó la MEB. En la figura 8 se observan electrofotomicrografías del grupo control a un aumento de 3,000x, en donde se observa una red multidireccional de fibras en su mayoría regulares y lineales. A pesar de ello también se encuentran fibras irregulares y trenzadas como en la figura 8a, las fibras presentes muestran variaciones en el grosor. En la figura 8b se observan algunas fibras con discontinuidad por la división fibrilar.



**Figura 8.-** Electrofotomicrografías de fibras PLA 10%, grupo control, a un aumento de 3,000x. a) Red de fibras de PLA 10% de diferentes grosores y una formación de fibras entrelazadas. b) Fibras irregulares delgadas y fibras de mayor grosor continuas multidireccionales.

En la figura 9 se observan electrofotomicrografías de fibras del grupo experimental A. En la figura 9a muestra una red fibrilar con irregularidades y algunas fibras presentan en lugar de su característica forma lineal cierta curvatura debido a la presencia de las partículas de HA. Las fibras se entrelazan y permiten variaciones en su grosor y se superponen entre ellas. También, se observan fibras y partículas de HA formados aglomerados de distintos tamaños. En la figura 9b, se observan las fibras y partículas de HA a mayor aumento (5,000x), se presentan como en la figura 9a un entrelazado fibrilar con variaciones en su grosor y conglomerados fibrilares con partículas de HA sobre ellos. La figura 9c, utilizó un aumento de 10,000x, se

observan como las fibras se entrelazan y se dividen para dar fibras de menor tamaño.

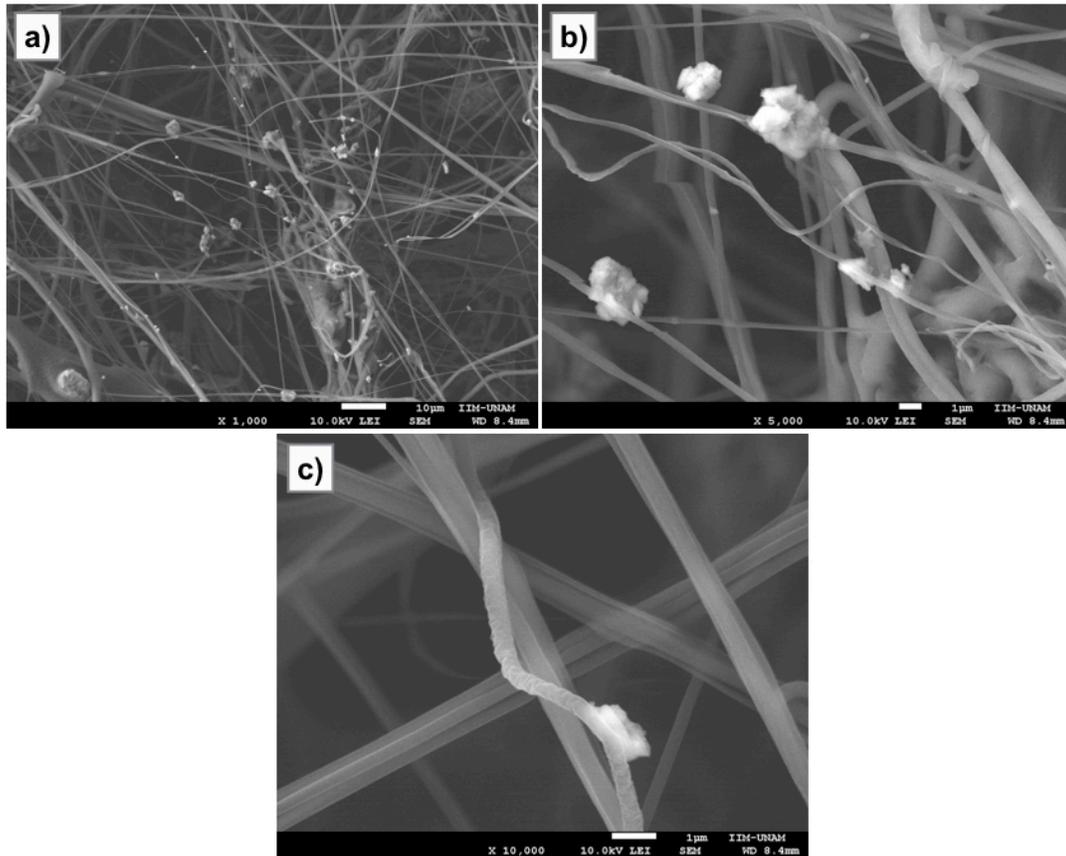


**Figura 9.-** Electrofotomicrografías de fibras PLA/HA 0.1. a) Acumulaciones de fibras de PLA 10% con pequeños grupos de partículas de HA a un aumento de 1,000x b) A un aumento de 5,000x una aglutinación de partículas de HA sobre fibras delgadas de PLA 10% y c) En un aumento de 10,000x fibras de PLA 10% unidas por su longitud formando una de mayor grosor.

En la figura 10a se observan una red fibrilar con fibras de distintos tamaños y varias de ellas pierden su linealidad. La mayoría de las fibras son delgadas y algunas se encuentran engrosadas por las partículas de HA. En la figura 10b, aumento de 5,000x, se aprecian fibras irregulares con variación en el grosor y enredadas entre sí, se sobreponen partículas de HA en grupos de diferentes tamaños.

En la figura 10c, aumento de 10,000x, se muestran fibras más homogéneas en tamaño y textura a excepción de una fibra, la cual se observa con una superficie

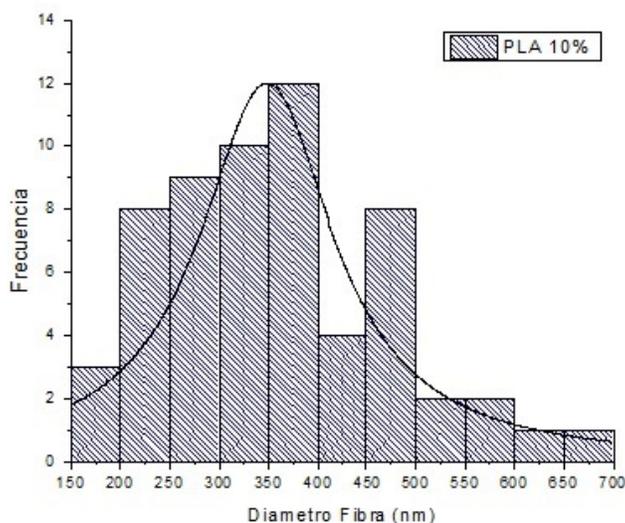
rugosa y curva en la que se encuentra una acumulación de partículas de HA sobre ella.



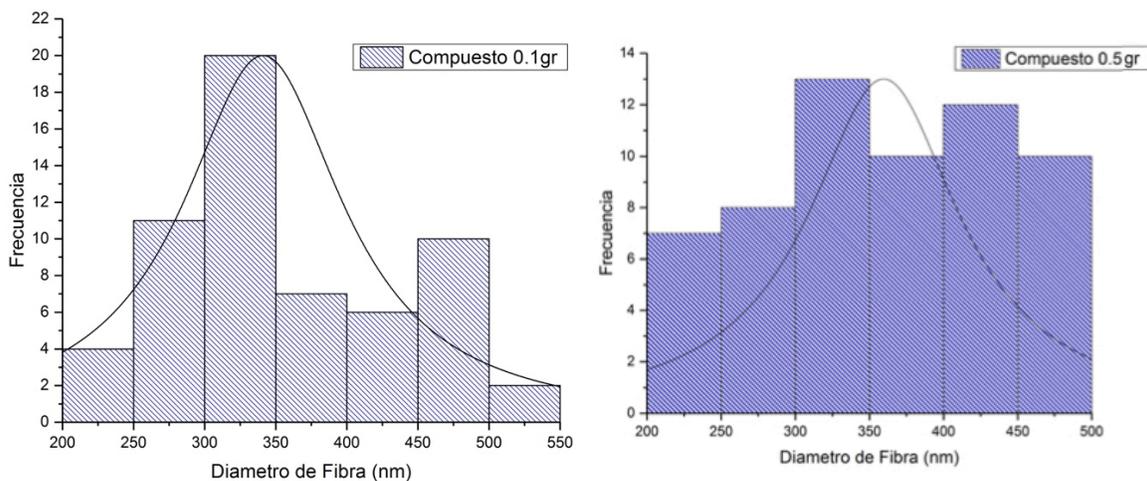
**Figura 10.-** Electrofotomicrografías de fibras PLA/HA 0.5 a) Fibras de PLA 10% irregulares con curvaturas en su trayecto y aglutinaciones de partículas de HA sobre ellas a un aumento de 1,000x. b) A mayor aumento las irregularidades fibrilares son perceptibles en fibras de menor grosor y en ellas se encuentran partículas de HA. c) Fibras lisas homogéneas y una fibra irregular y rugosa con una aglutinación de HA.

#### 4.4 Medición del diámetro de fibras

Se realizaron 30 mediciones al diámetro fibrilar de cada grupo (grupo control y grupos experimentales A y B) utilizando el software “Image J”. En la Figura 11 se observa que el diámetro de fibras del grupo control registrando un diámetro promedio de 350 nm, mientras en las fibras de los compuestos de los grupos experimentales A y B muestran un diámetro promedio entre los 335 y 360 nm, respectivamente. (Fig. 12).



**Figura 11.-** Histograma de medición del diámetro de fibra del PLA 10%.

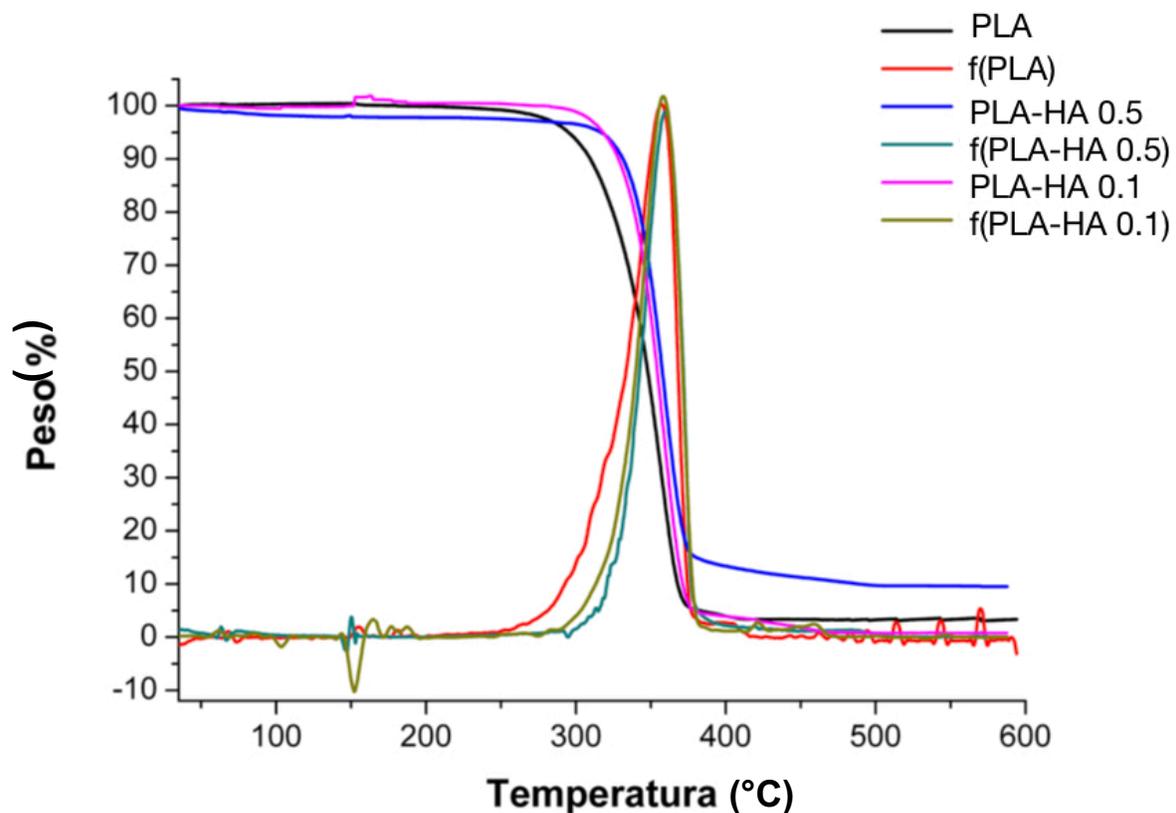


**Figura 12.-** Histograma de medición del diámetro de fibra del PLA/HAb 0.1 y PLA/HA 0.5.

#### 4.5 Termogravimetría (TGA)

Una curva característica de TGA para el PLA puede verse en la figura 13, línea negra. En la curva se observa un proceso térmico, el cual corresponde a la descomposición del PLA entre 270 °C y 370 °C. La línea roja de la figura 13, corresponde a la primera derivada de la línea negra, la cual nos permite determinar el momento en el cual inicia y termina la descomposición térmica. El grupo experimental A representado por la línea rosa en la figura 13, inicia su degradación

térmica a los 310 °C y finaliza su mayor degradación a los 380 °C, sin embargo, su peso continúa decreciendo hasta alcanzar una línea basal a los 500 °C. La línea verde en la figura 13, corresponde a la primera derivada de la línea rosa. En grupo experimental B representado por la línea azul en la figura 13, inicia su degradación térmica a los 320 °C y termina a una temperatura de 380 °C. La línea turquesa en la figura 13, corresponde a la primera derivada de la línea azul, cabe destacar que de igual modo que el grupo experimental A, su peso continúa decreciendo después de alcanzar los 380 °C hasta alcanzar una línea basal a los 500 °C, conservando el 9.51% del peso inicial, a diferencia de los compuestos del grupo control y experimental A los cuales perdieron la mayoría de su peso después de los 370 °C y 380 °C, respectivamente.



**Figura 13.-** TGA del PLA 10% está representada por una línea negra y su primera derivada por una línea roja, TGA del PLA/HA 0.1 está representada por una línea rosa y su primera derivada por una línea verde y TGA del PLA/HA 0.5 está representada por una línea azul y su primera derivada por una línea turquesa.

## 4.6 Caracterización por medio de FTIR

Nuestro resultado de FTIR se muestra en la figura 14. En ella observamos 4 espectros infrarrojos correspondientes a la HA, al grupo control, al grupo experimental A y al grupo experimental B. El espectro correspondiente a HA muestra bandas de absorción características de la biocerámica. La banda del carbonato se encuentra en  $872\text{ cm}^{-1}$ , la cual es característica de la HA de los tejidos mineralizados. También se observa la banda del fosfato, se encuentra a  $1026\text{ cm}^{-1}$ . Mientras, las bandas de las amidas I y II se encuentran presentes a  $1536\text{ cm}^{-1}$  y  $1658\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

El espectrograma del grupo control, PLA al 10%, muestra las siguientes bandas de absorción. La banda del grupo (C=O) a  $1750\text{ cm}^{-1}$ . La banda del estiramiento asimétrico de (CH<sub>3</sub>) se encuentra en  $1452\text{ cm}^{-1}$ , mientras la banda del estiramiento asimétrico está a  $1380\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas de (C-O) a  $1260\text{ cm}^{-1}$ , (C-O-C) en una absorbancia a  $1180\text{ cm}^{-1}$ . El (O-C-O) se refleja a  $1110\text{ cm}^{-1}$  y por último se encuentra la banda (CH<sub>3</sub>-C) en  $1073\text{ cm}^{-1}$ .

Los espectros del grupo experimental A y el grupo experimental B, presentan las bandas de absorción característicos del PLA. Las bandas de la HA, no se observan debido a que se encuentran cubiertas por las bandas del PLA (Tabla 4).

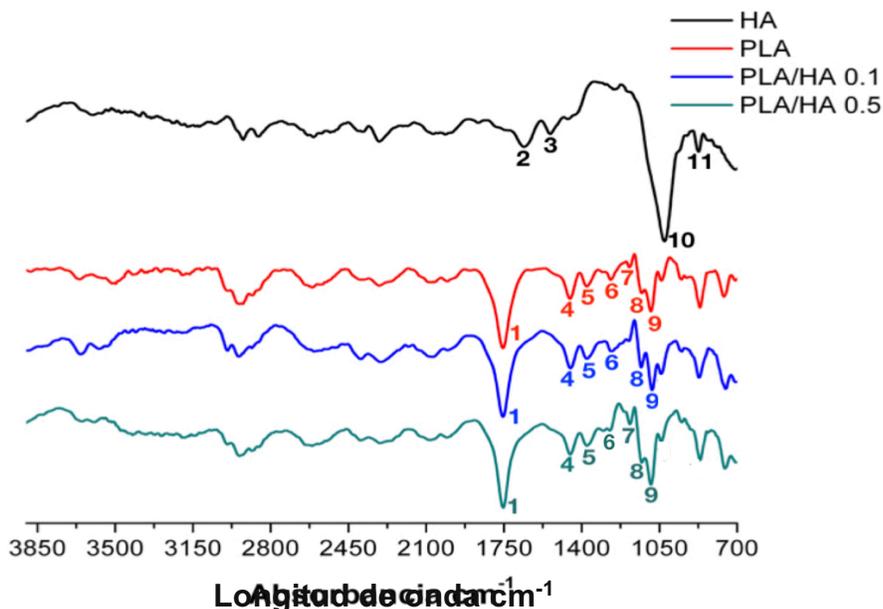


Figura 14. - FTIR de HA, PLA, y los compuestos (PLA/HA 0.1 y PLA/HA 0.5).

**Tabla 4.-** Grupos funcionales de la HA, PLA, PLA/HA 0.1 y PLA/HA 0.5. Absorbancia  $\text{cm}^{-1}$ .<sup>44, 48</sup>

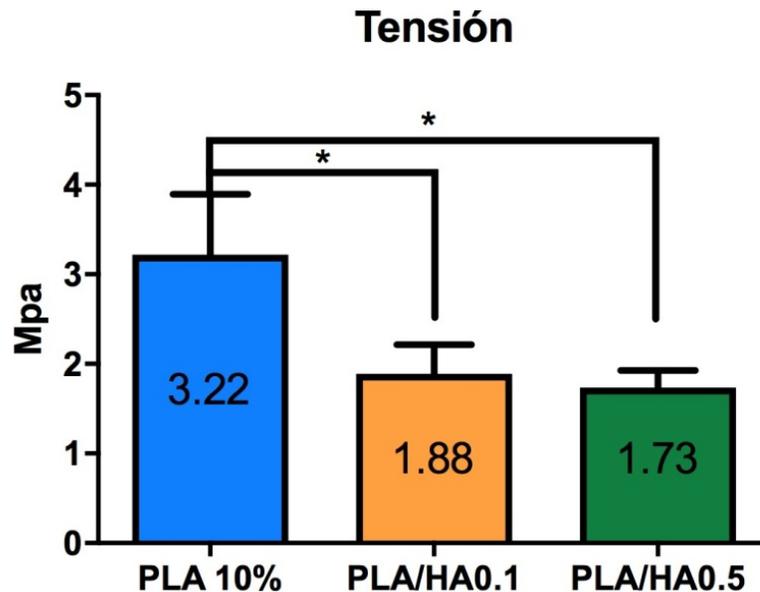
Grupos funcionales	No. de banda	HA	PLA	PLA/HA 0.1	PLA/HA 0.5
C=O	1	-	1750	1750	1750
C=O (Amida I)	2	1658	-	-	-
N-H (Amida II)	3	1536	-	-	-
CH <sub>3</sub>	4	-	1452	1452	1452
CH	5	-	1380	1380	1380
C-O	6	-	1260	1267	1267
C-O-C	7	-	1180	-	1182
O-C-O	8	-	1110	1115	1115
CH <sub>3</sub> -C	9	-	1073	1071	1071
PO	10	1026	-	-	-
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	11	872	-	-	-

## 4.7 Pruebas mecánicas

### 4.7.1 Ensayo de resistencia a la tensión

En la gráfica 1 se observa los resultados de resistencia a la tensión del grupo control y experimentales A y B. El grupo control obtuvo un promedio de 3.22 Mpa con una DE  $\pm 0.67$ , mientras que el grupo experimental A presentó un promedio de 1.88 Mpa con una DE  $\pm 0.32$  a diferencia del grupo experimental B donde se observó un promedio de 1.73 Mpa con una DE  $\pm 0.19$  en la prueba de resistencia a la tensión. Se aplicó la prueba estadística ANOVA (*por sus siglas en inglés: Analysis of Variance*) a los datos obtenidos tomando como valores significativos ( $p$  menores a 0.05) con un IC del 95% y posteriormente se realizó una prueba post hoc (comparación múltiple de Tukey) los cuales mostraron diferencias significativas entre el grupo control con el grupo experimental A y el grupo control con el grupo

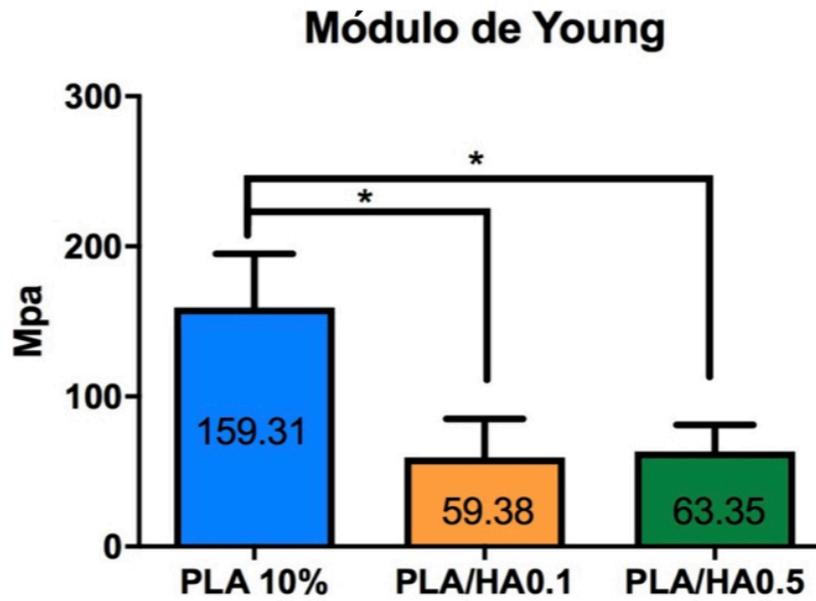
experimental B en comparación con los grupos experimentales A y B los cuales presentaron una  $p > 0.05$ .



Gráfica 1.- Resistencia a la tensión de los distintos grupos de andamios, ANOVA ( $p < 0.001$ ).

#### 4.7.2 Módulo de Young

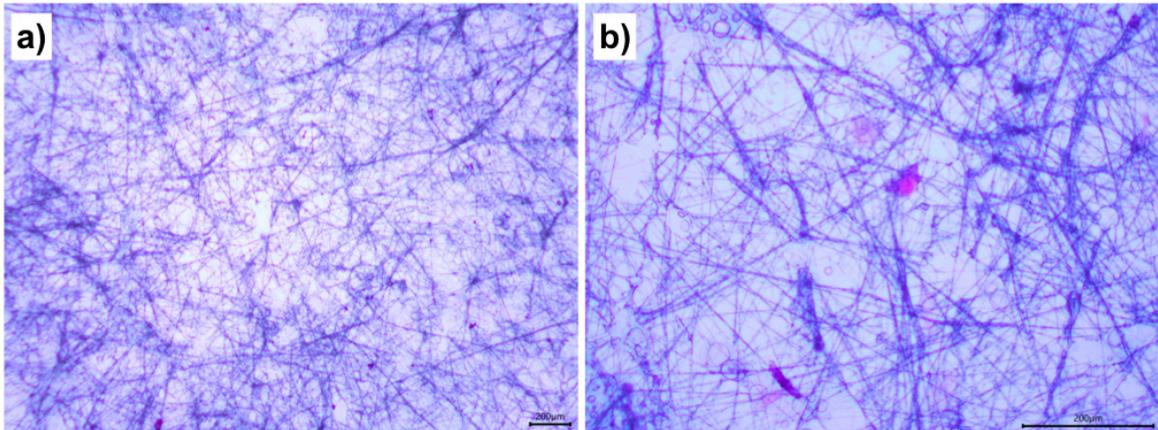
En la gráfica 2 se observa los resultados del módulo de Young del grupo control y experimentales A y B. El grupo control obtuvo un promedio de 159.31 Mpa, mientras que el grupo experimental A presentó un promedio de 59.38 Mpa a diferencia del grupo experimental B donde se observó un promedio de 63.35 Mpa en la prueba de módulo de elasticidad. Se aplicó la prueba estadística ANOVA a los datos obtenidos tomando como valores significativos ( $p$  menores a 0.05) con un IC del 95% y posteriormente se realizó una prueba post hoc (comparación múltiple de Dunnett) los cuales mostraron diferencias significativas entre el grupo control con el grupo experimental A y el grupo control con el grupo experimental B.



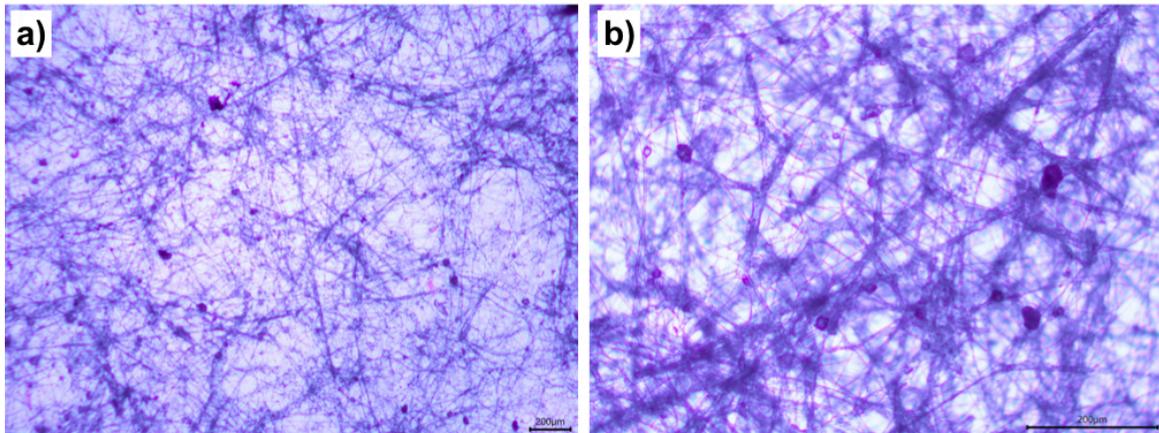
**Gráfica 2.-** Módulo de elasticidad de los distintos grupos de andamios, ANOVA ( $p < 0.001$ ).

#### 4.8 Adhesión celular

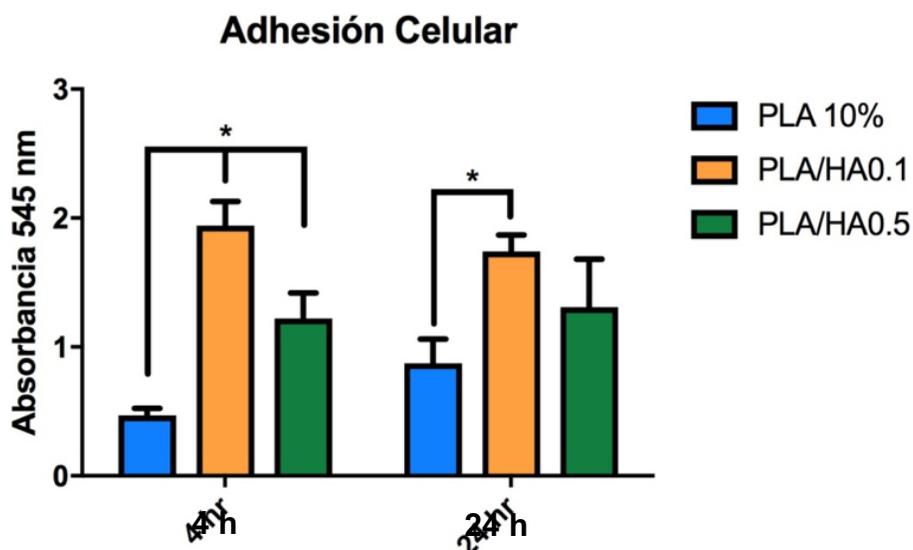
El ensayo de adhesión celular se realizó mediante cristal violeta a 4 y 24 horas que se observa en la gráfica 3. El grupo control a las 4 horas obtuvo un promedio de 0.469 absorbancia y a las 24 horas de 0.873 absorbancia, mientras que el grupo experimental A a las 4 horas presentó un promedio de 1.941 absorbancia y a las 24 horas de 1.742 absorbancia a diferencia del grupo experimental B a las 4 horas se observó un promedio de 1.220 absorbancia y a las 24 horas de 1.309 absorbancia en el ensayo de adhesión celular. Se aplicó la prueba estadística ANOVA a los datos obtenidos tomando como valores significativos ( $p$  menores a 0.05) con un IC del 95% y posteriormente se realizó una prueba post hoc (comparación múltiple de Sidak) los cuales mostraron diferencias significativas a las 4 horas entre todos los grupos de estudio y a las 24 horas únicamente se presentó diferencia significativa entre el grupo control con el grupo experimental A, en comparación entre el grupo control con el grupo experimental B y entre los grupos experimentales A y B los cuales presentaron una  $p > 0.05$ .



**Figura 15.** - Fotomicrografía de adhesión celular del compuesto de PLA 10% con método de cristal violeta. a) y b) A unos aumentos de 4x y 10x. fibras de PLA 10% con fibroblastos de pulpa dental humana



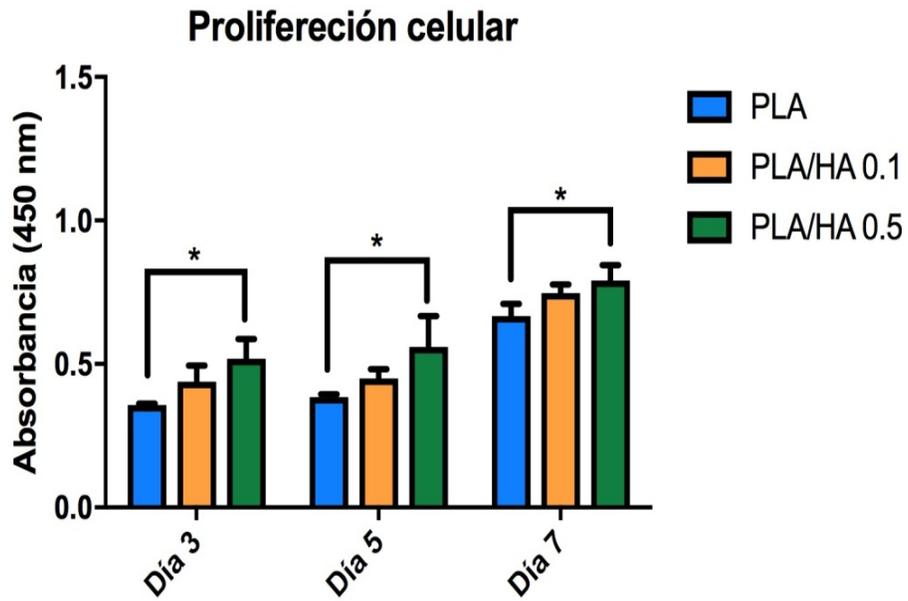
**Figura 16.** - Fotomicrografía de adhesión celular del compuesto de PLA/HA con método de cristal violeta. a) y b) A unos aumentos de 4x y 10x. se muestran fibras de PLA 10% con partículas de HA, en las cuales se observan mayor cantidad que el grupo control de fibroblastos de pulpa dental humana.



Gráfica 3.- Adhesión celular de los distintos grupos de andamios a las 4 y 24hrs, ANOVA (p<0.001).

#### 4.9 Ensayo de proliferación celular

Después de evaluar la citotoxicidad de los andamios de los grupos de estudio con 3 muestras cada grupo por día mediante el ensayo de WTS-1 a los 3, 5 y 7 días, Los resultados de la proliferación celular se muestran en la gráfica 4. El grupo control en el día 3 obtuvo un promedio de 0.357 absorbancia; el día 5 de 0.385 absorbancia y el día 7 de 0.666 absorbancia, mientras que el grupo experimental A en el día 3 presentó un promedio de 0.438 absorbancia; el día 5 de 0.455 absorbancia y el día 7 de 0.746 absorbancia a diferencia del grupo experimental B en el día 3 donde se observó un promedio de 0.518 absorbancia; en el día 5 de 0.559 absorbancia y el día 7 de 0.790 absorbancia en el ensayo de proliferación celular. Se aplicó la prueba estadística ANOVA a los datos obtenidos tomando como valores significativos (p menores a 0.05) con un IC del 95% y posteriormente se realizó una prueba post hoc (comparación múltiple de Tukey) los cuales mostraron diferencias significativas en los días 3, 5 y 7 entre el grupo control con el grupo experimental B a diferencia del grupo control con el grupo experimental A y entre los grupos experimentales A y B los cuales presentaron una  $p > 0.05$ . Sin embargo, ambos compuestos con HA permiten proliferación celular.



**Gráfica 4.-** Prolifereción celular de los distintos grupos de andamios a los 3, 5 y 7 días, ANOVA ( $p < 0.001$ ).

# **CAPITULO 5**

# **DISCUSIÓN**

La bioingeniería de tejidos en los últimos años ha sido de gran importancia en el campo de la medicina, con investigaciones enfocadas en la regeneración tisular principalmente de hueso, cartílago y piel. Esto es posible gracias a la interacción de células, biomateriales y moléculas bioactivas para inducir tejido nuevo. Se ha utilizado en el tratamiento de diversas enfermedades en su mayoría óseas, específicamente hablando de los andamios que son estructuras tridimensionales provisionales que tiene como objetivo actuar como una base biomimética la cual proporciona soporte e imitación de la matriz extracelular concediendo adhesión, proliferación y diferenciación celular los cuales estimularan la regeneración tisular deseada .<sup>46</sup>

Actualmente se busca utilizar biomateriales para mejorar las propiedades físicas y biológicas de andamios para regeneración ósea. Uno de ellos es el PLA un polímero biodegradable derivado del ácido láctico aprobado por la FDA y en recientes investigaciones se ha observado una respuesta celular mejorada al complementarlo con HA que es una cerámica que está presente en la matriz inorgánica de los huesos y dientes, con la capacidad osteoinductora que favorece en la respuesta celular, a pesar de sus excelentes propiedades biológicas, se caracteriza por tener una estructura frágil haciendo que su trabajo individual sea deficiente al carecer de una carga mecánica que soporte la remodelación ósea.<sup>7, 22, 23, 47</sup>

Por tal motivo la presente investigación fue diseñada para evaluar *in vitro* las características en combinación de ambos materiales para unificar sus propiedades.<sup>8</sup>

En este estudio se sintetizaron andamios de PLA al 10%, grupo control y dos grupos de estudio, grupo experimental A, PLA 10% + 0.1 g de HA orgánica y el grupo experimental B, PLA 10% + 0.5 g de HA orgánica.

Para estudiar la morfología de las nanofibras se utilizó la microscopía óptica y la microscopia electrónica de barrido. En las fibras del grupo control se observó una disposición relativamente uniforme de las fibras, una superficie lisa y continua, con variaciones en los tamaños, formando una estructura en forma de red y dimensiones

nanométricas. Mientras, en los andamios de los grupos experimentales se observaron fibras irregulares con rugosidades, perdiendo su linealidad y presentando líneas curvas debido al efecto de las partículas de HA. El grupo experimental B presentó un mayor número de conglomerados y partículas de HA sobre las fibras debido a su mayor concentración de HA. Un estudio anterior realizado por Sánchez-Arévalo F. *et al* en el 2016, sintetizaron compuestos de microfibras de PLA y PLA/HA a concentraciones de 2, 4 y 6% de origen sintético con la técnica de electrospinning, y observaron mediante MEB que las microfibras de PLA presentaron una superficie lisa y homogéneo; mientras que en PLA/HA 2% se observaron irregulares, en PLA/HA 4% las microfibras recuperaron su homogeneidad y en PLA/HA 6% saturaron el interior de la microfibra, comenzando a aparecer en la superficie<sup>48</sup>. Los resultados anteriores concuerdan con nuestros resultados, a mayor concentración de HA las nanofibras se saturan en el interior de los cristales y al seguir incrementando su concentración se presentan en la superficie de las fibras. Tal vez lo anterior se deba a que, al aumentar la concentración de HA, la HA no se dispersa uniformemente en el PLA. En un estudio realizado por Kim S. *et al* en el 2006 reportó que el PLA por lo general recubre a la HA dificultado su exposición en la superficie<sup>49</sup>, lo cual en nuestro estudio se presentó de manera distinta debido a que en el análisis de SEM observamos que la HA se encontró en la superficie recubriendo al PLA, en ambas concentraciones experimentales.

El tamaño de las fibras de colágena en el cuerpo humano tiene distintos tamaños, que oscilan entre 50 a 500 nm. El diseño de los andamios se ha encaminado a imitar a la matriz extracelular. El análisis de la medición de las fibras se observaron diferencias en el diámetro de las nanofibras. En el grupo control se encontró un promedio de 350 nm de diámetro, mientras para las fibras experimentales de los grupos A y B se determinaron diámetros de 335 y 360 nm, respectivamente. Esto debido a la presencia de HA, es de resaltar que el aumento en la concentración de HA, se encuentra ligado al aumento en el diámetro de las fibras.

Abdal-hay A. *et al* en 2013 compararon andamios de PLA con diferentes concentraciones de HA (0.1 y 0.3 g) con técnica de AJS obteniendo como resultado un promedio de diámetro de nanofibra de 780nm.<sup>44</sup> Interesantemente en un estudio realizado por Jeong S. *et al* en 2008 con andamios de PLA/HA por el método de electrospinning, encontraron que a mayor concentración de HA obtenían un diámetro fibra promedio y el cambio era debido al tamaño de poro de la fibra relacionado con el incremento de HA. En el estudio se obtuvieron un promedio de diámetro de 365 nm en fibras de PLA, 255 nm en PLA/HA al 5% y 135 nm en PLA/HA al 20%.<sup>50</sup> En comparación con nuestros resultados, donde obtuvimos un promedio de diámetro de 350 nm en el grupo control, 335 nm en el grupo experimental A y 360 nm en el grupo experimental B. Probablemente se deba a que en el método por electrospinning provee de fibras más delgadas debido a que la trayectoria es controlada mediante un campo eléctrico, a comparación al método de AJS, el cual nos proporciona fibras de mayor tamaño. Sin embargo, esto no quiere decir que una técnica sea mejor que la otra, simplemente que tienen distintas características y si necesitamos una fibra de menor tamaño nuestra mejor opción será utilizar electrospinning, en caso contrario donde ocupemos una fibra de mayor tamaño podremos optar por AJS. No obstante, el método de AJS nos confiere de múltiples ventajas como la fácil manipulación y la accesibilidad de contar con este sistema a diferencia del electrospinning el cual es de manipulación compleja y menos accesible.

La termogravimetría del grupo control se observó que su degradación térmica inició a una temperatura de 270 °C hasta 370 °C, y partir de los 400 °C mantuvo una basal de 3.35% en su peso. En el grupo experimental A, su degradación térmica inició a los 310 °C hasta los 380 °C. El grupo experimental B, presentó una degradación térmica en un rango de 320 °C y hasta 380 °C. A partir de los 500 °C mantuvo una constante en peso del 9.51%, a diferencia del grupo experimental A mantuvo una constante en peso del 0.74% después de la degradación térmica.

Jeong S. *et al* en 2008 realizó pruebas de TGA en andamios nanofibrilares de PLA al 10% y PLA con HA al 5 y 20% de origen sintético con técnica de electrospinning en el cual reporta que las nanopartículas de HA no sufrieron degradación térmica dentro del rango de 0 °C a 500 °C, mientras que los grupos de PLA al 10%, PLA/HA 5% y PLA/HA 20% reportaron degradación a los 300 °C culminando a los 400 °C, con una tasa de mantenimiento de 2% para el grupo de PLA, 5% para el compuesto de PLA/HA 5% y de 12.4% para PLA/HA 20%. Estos resultados concuerdan con nuestro estudio donde notamos una menor degradación final en compuestos con mayor concentración de HA, esto se debe a que la partícula de HA no sufre degradación térmica dentro del rango analizado por lo cual proporciona mejores características térmicas.<sup>50</sup>

En nuestro estudio se evaluaron los espectros infrarrojos correspondientes a la HA, al grupo control, al grupo experimental A y B. En el cual observamos bandas de la HA como lo son la banda del carbonato mostrada en  $872\text{ cm}^{-1}$ , la banda del fosfato a los  $1026\text{ cm}^{-1}$  y las bandas de las amidas I y II presentes a  $1536\text{ cm}^{-1}$  y  $1658\text{ cm}^{-1}$ , respectivamente.

Las bandas de absorción del grupo control mostraron al grupo (C=O) a  $1750\text{ cm}^{-1}$ , la banda de (CH<sub>3</sub>) en  $1452\text{ cm}^{-1}$  y la banda del (CH) está a  $1380\text{ cm}^{-1}$ . Las bandas de (C-O) a  $1260\text{ cm}^{-1}$ , (C-O-C) en una absorbancia a  $1180\text{ cm}^{-1}$ . El (O-C-O) se refleja a  $1110\text{ cm}^{-1}$  y por último se encuentra la banda (CH<sub>3</sub>-C) en  $1073\text{ cm}^{-1}$ .

Los espectros de los grupos experimentales mostraron bandas correspondientes al PLA y en conjunto se mostró un acoplamiento de las bandas de HA con el polímero de PLA que se hicieron evidentes.

Por otro lado, Abdal-hay A. *et al* observó los espectros infrarrojos de los compuestos de PLA; PLA/HA 0.1 y PLA/HA 0.3 caracterizados por medio de la técnica de AJS, donde observó una interacción y unión química del PLA con la HA, de las cuales la más sobresaliente fue la banda de absorción del (C-O-O) reportado alrededor de los  $1600\text{ cm}^{-1}$ . Sin embargo, la disminución en la banda de absorción del hidroxilo (-OH) reportado aproximadamente en  $3500\text{ cm}^{-1}$  lo toma como un argumento que respalda la interacción química entre las moléculas de PLA y HA.<sup>44</sup>

Estas observaciones se asemejan a nuestros resultados los cuales indican que hubo una interacción entre las moléculas del PLA y HA, de tal manera que el espectro infrarrojo fue similar entre el grupo control y los grupos experimentales A y B, con la única diferencia que en el grupo experimental con menor concentración de HA no se observó la banda de absorción del (C-O-C) la cual está presente en los otros grupos aproximadamente en el  $1182\text{ cm}^{-1}$ . Así mismo, concuerdo con la existencia de una relación entre la técnica de AJS y los resultados de la espectrometría infrarroja al pensar que las nanopartículas de HA no solo se cargaron en las fibras de PLA, sino que también interactuaron con el PLA, lo que dio como resultado una fuerte unión de la superficie dando un aporte a las propiedades del compuesto.<sup>44</sup>

Por otro lado, no hubo una diferencia significativa entre la morfología de las fibras en relación a los resultados de las pruebas mecánicas de tensión y módulo de elasticidad, de acuerdo a los hallazgos se observó que el módulo de elasticidad es inversamente proporcional con relación a la tensión. Con base en los resultados se observó que mientras el grupo experimental A disminuyó su módulo de elasticidad aumento el de resistencia a la tensión, en comparación con el grupo experimental B, el cual mostró un comportamiento inverso, mientras que aumento su módulo de elasticidad disminuyó el de resistencia a la tensión.

De acuerdo a los hallazgos descritos por Sánchez-Arévalo F. *et al* donde realizaron pruebas de resistencia a la tensión y módulo de Young en PLA puro, PLA/HA 2, 4 y 6% con resultados de módulo elástico de 473, 190, 384 y 395 MPa y de resistencia a la tensión de 13.7, 6.5, 10.5 y 11 MPa respectivamente, por lo que observó menor resistencia a la tensión y al módulo de elasticidad cuando se adicionaba menos del 2% de HA y por el contrario al aumentar la concentración HA mayor al 2%, incrementaba considerablemente sus características de tensión y elasticidad encontrando al compuesto de PLA/HA 6% con características similares al PLA puro excepto que presenta la ventaja de mejor adhesión y proliferación celular<sup>48</sup>; en comparación con nuestros resultados los cuales tuvieron una similitud en el módulo

de elasticidad donde a menor concentración de HA obtuvimos una menor resistencia contrario a una mayor concentración del compuesto, en cambio en la resistencia a la tensión fue opuesto ya que a menor concentración de HA hubo mayor resistencia a la tensión. Probablemente esto se debió a la velocidad de cruceta, en nuestro estudio fue una velocidad de 1 mm/min mientras que en el descrito previamente utilizaron una velocidad de 9.6 mm/min.

Sin embargo, en el estudio realizado por Abdal-hay A. *et al* con la técnica de AJS y una velocidad de cruceta fue la misma que utilizamos en nuestro estudio, reportó mayor fuerza a la tensión en compuestos de PLA, PLA/HA 0.1 y PLA/HA 0.3 en comparación con nuestros resultados, por otro lado se observó similitud en las comparaciones entre los grupos de estudio, en el cual a mayor concentración de HA se obtuvo mayor resistencia a la tensión, lo que concuerda con nuestros resultados.<sup>44</sup> Xu *et al* reporta que el uso de diferentes solventes, la concentración de PLA y la técnica usada puede atribuir diferentes características mecánicas.<sup>51</sup>

La adhesión celular se evaluó mediante un ensayo de absorción de cristal violeta, donde a los grupos de estudio y al grupo control se les agregó fibroblastos de pulpa dental humana observando que a las 4 horas el grupo con mayor adhesión celular fue el grupo experimental A, sin embargo tuvo un descenso a las 24 horas, por otro lado el grupo experimental B fue menor su adhesión a las 4 horas comparado con el grupo experimental A, no obstante presentó un incremento en la adhesión celular a las 24 horas a diferencia del otro grupo.

En comparación con un estudio realizado con la técnica de AJS por Altamirano A. *et al* en 2016 donde la variación de sus grupos de estudio se basó en la concentración del PLA y en la adición u omisión de HA 0.1 sintética, reportó que a las 4 horas la adhesión fue uniforme en todos los grupos, pero a las 24 horas y a menor concentración de PLA y con adición de HA se obtuvo una mejor adhesión.<sup>8</sup> Por tal motivo, podemos pensar que a una menor concentración de PLA y de HA

habrá una mejor adhesión debido a que los compuestos se formarán con mayor uniformidad y ese aspecto le conferirá una mejor estructura.

Para evaluar la proliferación celular se realizó un ensayo de WST-1 con intervalos de 3, 5 y 7 días en el cual se observó que el grupo experimental B tuvo mayor proliferación celular con respecto a nuestro grupo control y al grupo experimental A. Sin embargo, en comparación con los resultados de la adhesión celular, podemos pensar que si bien, ambos permiten proliferación celular, el grupo experimental B tiene un aumento progresivo en la adhesión celular y por lo tanto le confiere una mayor capacidad de proliferación celular.

Altamirano A. *et al* evaluó la viabilidad celular con células de medula ósea (BM- MSC) por medio del ensayo MTT en un intervalo de tiempo de 3, 5, 7 y 10 días en donde la proliferación celular se incrementó durante los primero tres intervalos de tiempo llegando a un declive al décimo día, lo cual podría explicar una posible diferenciación celular conducida por la presencia de HA.<sup>8</sup> De acuerdo con nuestros resultados podemos inferir que si se continuara estudiando más intervalos de tiempo podríamos llegar a una tasa de mantenimiento y finalmente a un declive en la proliferación celular, así como se describe en el estudio previo.

# **CAPÍTULO 6**

# **CONCLUSIONES**

- La técnica de AJS favoreció a la topografía fibrilar encontrándose dentro del rango de las escalas de fibras de colágena de la matriz extracelular.
- Con base en nuestros hallazgos en el MEB podemos concluir que el grupo experimental B presentó mayor disposición de partículas de HA que se aglomeraron sobre las fibras.
- Los andamios nanofibrilares de los grupos experimentales A y B tuvieron mejor respuesta biológica en comparación con el grupo control, debido a la adición de HA que le confirió una mejor proliferación y crecimiento de células fibroblásticas al ser un elemento más poroso.
- Los andamios nanofibrilares del grupo control tuvieron mejores resultados en las pruebas mecánicas en comparación con los grupos experimentales, esto debido a la posible adición de HA que pudo disminuir la resistencia a la tensión y el módulo elástico por la menor densidad de fibras que forma.
- Sin embargo, evaluando el módulo de elasticidad entre los grupos experimentales encontramos que al adicionar mayor concentración de HA se confiere mejores características de elasticidad.
- Se observó que el grupo experimental A tuvo mejor adhesión debido a que tiene mayor uniformidad favoreciendo su estructura. No obstante, a pesar de que ambos grupos tuvieron buena adhesión celular el grupo experimental B tuvo mejor respuesta en la proliferación celular.
- De acuerdo a los estudios de TGA el grupo experimental B fue el compuesto con una menor degradación en comparación con el grupo experimental A y el grupo control, suponemos que entre mayor contenido de HA tenga en su composición la degradación será menor.

- Es necesario realizar más investigaciones con un mayor número de grupos experimentales con variación de los porcentajes de PLA y HA para hallar la proporción ideal para la regeneración ósea.
- Nuestro prospecto a futuro es que se puedan sintetizar andamios de PLA/HA para su experimentación clínica y futura comercialización.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Langer R, Vacanti J. Tissue engineering. *Science*. 1993;260(5110):920-926.
2. Jeong S, Ko E, Yum J, Jung C, Lee Y, Shin H. Nanofibrous Poly (lactic acid)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Guided Tissue Regeneration. *Macromolecular Bioscience*. 2008;8(4):328-338.
3. Daculsi G, Goyenvalle E, Cognet R, Aguado E, Suokas E. Osteoconductive properties of poly(96L/4D-lactide) /beta-tricalcium phosphate in long term animal model. *Biomaterials*. 2011; 32(12) :3166-3177.
4. Ma P. Scaffolds for tissue fabrication. *Materials Today*. 2004;7(5):30-40.
5. Zhang R, Ma P. Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures. *Journal of Biomedical Materials Research*. 2000;52(2):430-438.
6. Zhang R, Ma P. Degradation behavior of porous poly ( $\alpha$ -hydroxy acids)/hydroxyapatite composite scaffolds. *Polymer Preprints*. 2000;41(2):1618-1619.
7. Roether J, Boccaccini A, Hench L, Maquet V, Gautier S, Jérôme R. Development and in vitro characterization of novel bioresorbable and bioactive composite materials based on polylactide foams and Bioglass® for tissue engineering applications. *Biomaterials*. 2002; 23(18): 3871-3878.
8. Altamirano VAA, Vargas BN, Vazquez VFC, Vargas KT, Montesinos MJJ, Alfaro ME, Álvarez PMA. Biocompatibilidad de andamios nanofibrilares con diferentes concentraciones de PLA/Hidroxiapatita. *Odovtos Journal of Dental Sciences*. 2016;18(3):39-47.
9. Ross M, Pawlina W. *Histology*. 7th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer Health, 2016; 233-261.
10. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363-408.
11. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010;466(7308):829-34.

12. Rauner M, Hofbauer L. Basics of Bone Biology. Principles of Osteoimmunology. 2016:1-30.
13. Caeiro, J.R., González, P., & Guede, D. Biomecánica y hueso (y II): ensayos en los distintos niveles jerárquicos del hueso y técnicas alternativas para la determinación de la resistencia ósea. Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral, 2013; 5(2), 99-108.
14. Seeman E, Delmas P. Bone Quality-The Material and Structural Basis of Bone Strength and Fragility. New England Journal of Medicine. 2006; 354(21): 2250-2261.
15. McMahon R, Wang L, Skoracki R, Mathur A. Development of nanomaterials for bone repair and regeneration. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. 2012;101B (2):387-397.
16. Tzelepi V, Tsamandas A, Zolota V, Scopa C. Bone Anatomy, Physiology and Function. Bone Metastases. 2009; 3-30.
17. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. Clinical Journal of the American Society of Nephrology. 2008; 3(3): S131-S139.
18. Nordin M, Frankel VH. Biomechanics of bone, Basic Biomechanics of the Musculoskeletal System, 4th ed. LWW, North American, 2012; 472.
19. Keaveny TM, Hayes WC. A 20-year Perspective on the Mechanical Properties of Trabecular Bone, J Biomech Eng, 1993; 115: 534-542.
20. Saiful I. Wan A. Biodegradable Polymers and Bone Applications: A Review. International Journal of Basic & Applied Science. 2012; 12 (1): 31.
21. Dorozhkin S, Epple M. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates. Angewandte Chemie International Edition. 2002;41(17):3130-3146.
22. Hernandez T R, Palma C R, Piña B C. Hidroxiapatita y sus aplicaciones. Revista Mexicana de Física. 1998; 45:144-147.
23. Kanno C, Sanders R, Flynn S, Lessard G, Myneni S. Novel Apatite-Based Sorbent for Defluoridation: Synthesis and Sorption Characteristics of Nano-micro-crystalline Hydroxyapatite-Coated-Limestone. Environmental Science & Technology. 2014;48(10):5798-5807.

24. Kalita S, Bhardwaj A, Bhatt H. Nanocrystalline calcium phosphate ceramics in biomedical engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 2007;27(3):441-449.
25. Lu X, Zhang H, Guo Y, Wang Y, Ge X, Leng Y et al. Hexagonal hydroxyapatite formation on TiO<sub>2</sub> nanotubes under urea modulation. *CrystEngComm*. 2011;13(11):3741.
26. Uskoković V. The Role of Hydroxyl Channel in Defining Selected Physicochemical Peculiarities Exhibited by Hydroxyapatite. *RSC advances*; 2015. 5, 36614-36633.
27. Park J. *Bioceramics: Properties, Characterizations, and Applications*. 1st ed. Nueva York, NY: Springer; 2008.
28. Martin I, Wendt D, Heberer M. The role of bioreactors in tissue engineering. *Trends in Biotechnology*. 2004;22(2):80-86.
29. Bhumiratana S, Vunjak-Novakovic G. Engineering Functional Bone Grafts. *Tissue Engineering in Regenerative Medicine*. 2011; 221-235.
30. O'Brien F. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today*, 2011; 14: 88-95.
31. Babensee J, Anderson J, McIntire L, Mikos A. Host response to tissue engineered devices. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 1998; 33(1-2): 111-139.
32. Brown B, Valentin J, Stewart-Akers A, McCabe G, Badylak S. Macrophage phenotype and remodeling outcomes in response to biologic scaffolds with and without a cellular component. *Biomaterials*. 2009; 30(8): 1482-1491.
33. Lyons F, Al-Munajjed A, Kieran S, Toner M, Murphy C, Duffy G et al. The healing of bony defects by cell-free collagen-based scaffolds compared to stem cell-seeded tissue engineered constructs. *Biomaterials*. 2010; 31(35): 9232-9243.
34. Chan, B, & Leong, K. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*; 2009. 17(S4), 467-479.

35. Hutmacher D. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials*. 2000; 21(24): 2529-2543.
36. Kulkarni RK, Pani KC, Neuman C, Leonard F. Polylactic Acid for Surgical Implants. *Arch Surg*. 1966; 93(5): 839–843.
37. Hermínio Silva T, Elvis de Oliveira J, Souto de Medeiros E. PVC micro and nanofibers produced via Solution Blow Spinning. *Polímeros*. 2015;25(2):229-235.
38. Gómez-Pachón E, Sánchez-Arévalo F, Sabina F, Maciel-Cerda A, Campos R, Batina N et al. Characterisation and modelling of the elastic properties of poly (lactic acid) nanofibre scaffolds. *Journal of Materials Science*. 2013;48(23):8308-8319.
39. Xiao L., Wang B., Yang G., Gauthier M. "Poly (Lactic Acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications". *Biomedical Science, Engineering and Technology*, Prof. Dhanjoo N. Ghista (Ed.). 2007; 978-953-307-471-9.
40. Fambri L, Pegoretti A, Fenner R, Incardona S, Migliaresi C. Biodegradable fibres of poly (l-lactic acid) produced by melt spinning. *Polymer*. 1997; 38(1): 79-85.
41. Gupta B, Revagade N, Hilborn J. Poly (lactic acid) fiber: an overview. *Prog Polym Sci* 2007; 34: 455-482.
42. Armentano I, Dottori M, Fortunati E, Mattioli S, Kenny J. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review. *Polymer Degradation and Stability*. 2010; 95(11): 2126-2146.
43. François S, Chakfé N, Durand B, Laroche G. A poly (l-lactic acid) nanofibre mesh scaffold for endothelial cells on vascular prostheses. *Acta Biomaterialia*. 2009;5(7):2418-2428.
44. Abdal-hay A, Sheikh F, Lim J. Air jet spinning of hydroxyapatite/poly (lactic acid) hybrid nanocomposite membrane mats for bone tissue engineering. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013; 102: 635-643.

45. Barnes C, Sell S, Boland E, Simpson D, Bowlin G. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2007; 59(14): 1413-1433.
46. Granados-Hernández, M., Serrano-Bello, J., Montesinos, J., Alvarez-Gayosso, C., Medina-Velázquez, L., Alvarez-Fregoso, O., & Alvarez-Perez, M. In vitro and in vivo biological characterization of poly (lactic acid) fiber scaffolds synthesized by air jet spinning. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. 2017; 106(6), 2435-2446.
47. Liu, X., & Ma, P. Polymeric Scaffolds for Bone Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*. 2004; 32(3), 477-486.
48. Sánchez-Arévalo, F., Muñoz-Ramírez, L., Álvarez-Camacho, M., Rivera-Torres, F., Maciel-Cerda, A., Montiel-Campos, R., & Vera-Graziano, R. Macro- and micromechanical behaviors of poly(lactic acid)–hydroxyapatite electrospun composite scaffolds. *Journal Of Materials Science*. 2016; 52(6), 3353-3367.
49. Kim, S., Sun Park, M., Jeon, O., Yong Choi, C., & Kim, B. Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2006; 27(8), 1399-1409.
50. Jeong, S., Ko, E., Yum, J., Jung, C., Lee, Y., & Shin, H. Nanofibrous Poly(lactic acid)/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Guided Tissue Regeneration. *Macromolecular Bioscience*. 2008; 8(4), 328-338.
51. Xu, X., Chen, X., Liu, A., Hong, Z., & Jing, X. Electrospun poly(l-lactide)-grafted hydroxyapatite/poly(l-lactide) nanocomposite fibers. *European Polymer Journal*. 2007; 43(8), 3187-3196.